

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA  
Autorização Decreto nº 9237/86. DOU 18/07/96. Reconhecimento: Portaria  
909/95, DOU 01/08-95

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS  
CAMPUS III – JUAZEIRO  
Colegiado de Engenharia Agrônômica



**LEONILSON OSVALDO DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bradyrhizobium*  
spp e *Azospirillum brasilense* NA PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE FEIJÃO-CAUPI**

**JUAZEIRO – BA  
2024**

**LEONILSON OSVALDO DA SILVA**

Monografia apresentada à Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, UNEB/DTCS *campus* III, Colegiado de Engenharia Agrônômica como um dos pré-requisitos para a disciplina de Trabalho de conclusão de curso – TCC.

**ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bradyrhizobium* spp e *Azospirillum brasilense* NA PROMOÇÃO CRESCIMENTO DE FEIJÃO-CAUPI**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lindete Miria Vieira Martins

Coorientador: Mestrando Bruno Gabriel Amorim Barros

**JUAZEIRO - BA**

**2024**

LEONILSON OSVALDO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bradyrhizobium* spp e *Azospirillum brasilense* NA PROMOÇÃO CRESCIMENTO DE FEIJÃO-CAUPI**

Monografia apresentada à Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, UNEB/DTCS *campus* III, Curso de Engenharia Agrônômica, como um dos pré-requisitos para a disciplina de Trabalho de conclusão de curso – TCC.

Aprovado em 19/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Lindete Miria Vieira Martins

Prof. Dr<sup>a</sup>. LINDETE MIRIA VIEIRA MARTINS (Presidente/Orientadora)

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - III

Teonis Batista da Silva

Doutorando TEONIS BATISTA DA SILVA (primeiro examinador)

Ciências Agrárias - Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Verônica de Castro Leal

Doutoranda VERÔNICA DE CASTRO LEAL (segunda examinadora)

Ciências do Solo - Universidade Federal do Rural de Pernambuco (UFRPE)

Layslene Leal de Carvalho

Mestranda LAYSLENE LEAL DE CARVALHO (terceira examinadora)

Agronomia: Horticultura Irrigada – Universidade do Estado da Bahia

Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – III

Paulo Roberto B. de Jesus Junior

Mestrando PAULO ROBERTO BARBOSA DE JESUS JUNIOR (quarto examinador)

Agronomia: Horticultura Irrigada – Universidade do Estado da Bahia

Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – III

JUAZEIRO - BA

2024

À minha querida esposa, Fabrícia Gonçalves Pereira  
e aos meus amados pais, Sr. Valdeci Osvaldo da Silva e Sr<sup>a</sup>. Maria Ana da Silva,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de conclusão de curso representa a culminação de uma jornada que não teria sido possível sem o apoio e incentivo de várias pessoas especiais em minha vida.

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus queridos pais, Sr. Valdeci Osvaldo da Silva e Sr<sup>a</sup>. Maria Ana da Silva, agradeço pelo amparo inquestionável e expresse minha profunda gratidão. Vocês foram meus primeiros e mais importantes professores, e tudo o que sou hoje devo ao amor, aos valores e à educação que me proporcionaram. Seu apoio incondicional e incentivo constante foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Leonardo Osvaldo da Silva e Leonildo Osvaldo da Silva, agradeço por sempre estarem ao meu lado, compartilhando alegrias e desafios. Cada momento de cumplicidade, cada palavra de incentivo e cada gesto de carinho foram essenciais para que eu mantivesse a motivação e a força necessária durante toda esta caminhada.

À minha esposa, Fabrícia Gonçalves Pereira, dedico um agradecimento especial. Sua paciência, compreensão e amor foram meu alicerce nos momentos de dificuldade. Sua presença constante, palavras de encorajamento e apoio inabalável me deram a confiança para seguir em frente e concluir esta fase na minha vida. Agradeço também aos meus enteados, Filipe, Ítalo e Thiago pela paciência e compreensão durante essa fase intensa dos meus estudos.

Não posso deixar de mencionar minha tia, Joselene Ana de Souza, e meu tio, Edson Rodrigues dos Santos, que sempre estiveram presentes em minha vida, oferecendo suporte e motivação. As conversas, os conselhos e o carinho de vocês foram importantes para que eu me sentisse sempre amparado e confiante em minhas escolhas. É claro que agradeço também aos meus primos Emerson e Eduardo, cuja presença e apoio foram importantes durante este processo.

Agradeço ao meu sogro, Sr. Basto; à minha sogra, dona Alzira; aos meus cunhados Francisco, Alci e João Neto; e à minha cunhada, Alessandra pelo apoio e compreensão durante este período desafiador.

Aos amigos que a graduação me proporcionou, Victor, Laíres, Carol, Ivonice, Vinicius, Roberto, Pedro, agradeço pela amizade, discussões acadêmicas, trabalhos em conjunto, momentos de descontração. Esses momentos compartilhados tornaram essa jornada muito mais agradável e significativa.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo, Lucas, Paula, Maria Eduarda, Dione, Milena, Mario e Francinaldo, que tanto me ajudaram durante o experimento e rotinas diárias no laboratório, deixo meu profundo agradecimento.

À Equipe de Manutenção do Hospital Regional de Juazeiro, em especial ao encarregado de setor, Gilvan, pelo suporte e pela flexibilização que me permitiram conciliar os estudos com as minhas responsabilidades profissionais.

Aos Professores e Servidores desta instituição - UNEB *campus* III em Juazeiro, em especial a professora, Cris Sales e o professor Flávio José, também ao pessoal do colegiado, em especial a Charliane, meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Lindete Miria Vieira Martins, pelo apoio, por suas valiosas orientações e conselhos ao longo de toda a jornada deste trabalho. Sua sabedoria, paciência foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Também gostaria de agradecer imensamente ao meu coorientador, Bruno Gabriel Amorim Barros, cuja presença constante e dedicação foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. Suas correções, incentivos e orientações foram de extrema importância para a qualidade do projeto. Agradeço por todo o tempo dedicado, pelas palavras encorajadoras e por acreditar no meu potencial, incentivando-me a buscar sempre a excelência.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos vocês, meu sincero e profundo agradecimento. Este trabalho é tanto meu quanto de vocês, e sou imensamente grato por ter cada um de vocês em minha vida.

## RESUMO

Tendo em vista a evidente necessidade de estratégias para melhorar o manejo do nitrogênio na cultura de feijão-caupí, com o intuito de aumentar seu potencial produtivo, reduzir o uso de adubação química e minimizar os impactos ao meio ambiente. O presente trabalho estudou a co-inoculação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp e *Azospirillum brasilense* na promoção do crescimento de feijão-caupí em amostra de Neossolo Flúvico no Submédio do Vale do São Francisco. Foi realizado uma pesquisa em casa de vegetação do DTCS-UNEB, na qual foram utilizadas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense*. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 13 tratamentos e 04 repetições. Os tratamentos são: testemunha absoluta (T01); aplicação de nitrogênio mineral (T02); inoculação com *A. Brasilense* (T03); inoculação com *Bradyrhizobium* (BR 3262) (T04); inoculação com *Bradyrhizobium* (BR 3267) (T05); co-inoculação de *Bradyrhizobium* (BR 3262) + *A. Brasilense* (T06); co-inoculação de *Bradyrhizobium* (BR 3267) + *A. brasilense* (T07); co-inoculação de ESA 168 + *A. Brasilense* (T08); co-inoculação de ESA 192 + *A. Brasilense* (T09); co-inoculação de ESA 370 + *A. Brasilense* (T10); co-inoculação de ESA 377 + *A. Brasilense* (T11); co-inoculação de ESA 378 + *A. Brasilense* (T12); co-inoculação de ESA 380 + *A. Brasilense* (T13), totalizando 52 unidades amostrais. O experimento foi realizado em vasos, utilizando a variedade BRS Acauã de feijão-caupí, após 30 dias da germinação no período conhecido como pré-florada, as plantas foram submetidas a análises fitotécnicas de altura de parte aérea e raiz e massas frescas e secas de parte aérea e raiz, bem como análises fisiológicas de índice SPAD nos 15 e 30 após emergência. De acordo com o presente estudo, a co-inoculação entre estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* pode promover maior eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em plantas de feijão-caupí cultivado em amostra de solo do Semiárido. Dessa forma, faz-se necessária a instalação de novos experimentos, afim de investigar o potencial dessas estirpes em termos de eficiência agrônômica.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*; Fixação Biológica de Nitrogênio; Co-inoculação.

## ABSTRACT

Considering that it is evident the need for strategies to improve nitrogen management in cowpea crops, in order to increase its productive potential, reduce the use of chemical fertilization and the impacts on the environment. The present work studied the co-inoculation of bacteria of the genus *Bradyrhizobium* spp and *Azospirillum brasilense* in promoting the growth of cowpea in a sample of Fluvic Neosol in the Lower São Francisco Valley. A research was carried out in a greenhouse of DTCS-UNEB, in which strains of *Bradyrhizobium* spp and *A. brasilense* were used. The completely randomized design (DIC) was adopted, with 13 treatments and 04 replications. The treatments are: absolute control (T01); mineral nitrogen application (T02); inoculation with *A. brasilense* (T03); inoculation with *Bradyrhizobium* (BR 3262) (T04); inoculation with *Bradyrhizobium* (BR 3267) (T05); co-inoculation of *Bradyrhizobium* (BR 3262) + *A. Brasilense* (T06); co-inoculation of *Bradyrhizobium* (BR 3267) + *A. brasilense* (T07); co-inoculation of ESA 168 + *A. Brasilense* (T08); co-inoculation of ESA 192 + *A. Brasilense* (T09); co-inoculation of ESA 370 + *A. Brasilense* (T10); co-inoculation of ESA 377 + *A. Brasilense* (T11); co-inoculation of ESA 378 + *A. Brasilense* (T12); co-inoculation of ESA 380 + *A. Brasilense* (T13), totaling 52 sample units. The experiment was carried out in pots, using the BRS Acauã variety of cowpea, after 30 days of germination in the period known as pre-flowering, the plants were subjected to phytotechnical analyses of shoot and root height and fresh and dry mass of shoot and root, as well as physiological analyses of SPAD index in 15 and 30 after emergence. According to the present study, the co-inoculation between strains of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* can promote greater efficiency in Biological Nitrogen Fixation (BNF) in cowpea plants grown in a soil sample from the Semi-arid region. Thus, it is necessary to install new experiments in order to investigate the potential of these strains in terms of agronomic efficiency.

**Keywords:** *Vigna unguiculata*; Biological Nitrogen Fixation; Co-inoculation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Crescimento das bactérias *Bradyrhizobium* spp em meio de cultura YMA para posteriormente serem usadas na produção dos inoculantes.....16
- Figura 2.** A- Cultivo das bactérias *Bradyrhizobium* spp em placas de Petri dentro da BOD; B- Erlenmeyers em agitador orbital em preparo dos inoculantes.....17
- Figura 3. Imagem A** - Pesagem das britas colocadas no fundo do vaso para melhorar na drenagem da água de irrigação (peso do vaso não foi considerado); **Imagem B** - Preenchimento dos vasos com solo, mediante pesagem para completar a área superficial do recipiente de cultivo.....18
- Figura 4.** Irrigação dos vasos do experimento utilizando proveta graduada para controlar a quantidade de água a ser aplicada.....18
- Figura 5.** Seleção das sementes, processo de catação manual para retirada das sementes inviáveis para uso no trabalho.....19
- Figura 6.** Sementes de feijão caupí submergidas em inoculantes e co-inoculantes.....20
- Figura 7.** Processo de desbaste e de reinoculação das bactérias com 7 dias após a emergência (DAE); **A**- antes do desbaste; **B**- após o desbaste; **C**- Processo de reinoculação das bactérias na região do colo das plantas .....20
- Figura 8.** Amostra do desenvolvimento da parte aérea das plantas de feijão, sob diferentes tratamentos nas condições do experimento.....23
- Figura 9.** Amostra do desenvolvimento das raízes, sob diferentes tratamentos conforme condições do experimento.....24
- Figura 10.** Raiz da planta de feijão após lavagem com formação de nódulos .....27
- Figura 11.** Médias de número de nódulos por planta em função dos diferentes tratamentos.....28
- Figura 12.** Comparação das médias de massa seca dos nódulos em função dos diferentes tratamentos.....29
- Figura 13.** Análise de clorofila, com o auxílio do equipamento ClorofiLOG Falker®.....31
- Figura 14.** Comparação das médias de Clorofila A e B aos 15 DAE .....32
- Figura 15.** Comparação das médias obtidas para Clorofila A e B aos 30 DAE.....33

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Resultado da análise química do solo da área do pivô central UNEB utilizado no trabalho.....18

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação. Tratamentos e respectivas bactérias inoculadas e co-inoculadas. CPA- Comprimento da Parte Aérea; MFPA- Massa Fresca da Parte Aérea; MSPA- Massa Seca da Parte Aérea; CR- Comprimento das Raízes; MFR- Massa Fresca das Raízes; MSR- Massa Seca das Raízes. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.....27

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BOD – Biochemical Oxygen Demand – (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

DAE – Dias Após a Emergência

CA – Controle Absoluto

CN – Controle Nitrogenado

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CPA – Comprimento da parte aérea

CR – Comprimento Das Raízes

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

MFPA – Massa Fresca Da Parte Aérea

MFR – Massa Fresca Das Raízes

MSR – Massa Seca Das Raízes

NN – Número de Nódulos

MSPA – Massa Seca Da Parte Aérea

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.1. LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	16
2.2. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO .....	17
2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS .....	21
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	21
3.1.1. Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa Fresca da Parte Aérea (MFPA) .	22
3.1.2. Massa Seca Da Parte Aérea (MSPA) .....	23
3.1.3. Comprimento Da Raiz (CR) .....	24
3.1.4. Massa Fresca das Raízes (MFR) e Massa Seca das Raízes (MSR).....	25
3.2. NODULAÇÃO .....	27
3.2.1. NÚMERO DE NÓDULOS .....	27
3.2.2. MASSA SECA DOS NÓDULOS .....	28
3.3. PARÂMETROS DE CLOROFILA.....	30
3.3.1. Clorofila (A) e (B) 15 Dias Após A Emergência .....	30
3.3.2. Clorofila (A) e (B) 30 Dias Após A Emergência .....	32
4. CONCLUSÃO .....	34
5. REFERÊNCIAS .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura de origem africana, também conhecida popularmente como feijão-de-corda ou feijão macassar. É uma planta da família das Fabaceas, do gênero *Vigna*, introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses no estado da Bahia (Freire Filho, 2011). Embora cultivado em todo o Brasil, o feijão-caupí é especialmente importante do ponto de vista socioeconômico nas regiões Norte e Nordeste. Seus grãos são providos de alto valor de proteínas, carboidratos, fibras e minerais (Andrade *et al.*, 2023). Dessa forma, a cultura é vista como um produto interessante para os agricultores que possuem recursos tecnológicos de produção limitados (Filgueira *et al.*, 2009).

A estimativa brasileira de produção total de grãos do feijão-caupí para a safra de 2023/24 foi de aproximadamente 619,2 mil toneladas, simbolizando um aumento de 11,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2024). Na Região Norte/Nordeste os valores foram de 509,8 mil toneladas com uma produtividade média de 446 kg/ha<sup>-1</sup> durante a safra mencionada, representando assim 82,3% da produção nacional. Na Bahia, os dados mostram uma estimativa de aproximadamente 125 mil toneladas em três safras consecutivas de 2023/24. Dessa forma, o estado é responsável por cerca de 24,4% da produção da Região Norte/Nordeste e 20% no Brasil (CONAB, 2024).

A variedade de feijão-caupí, BRS Acauã, foi desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sendo recomendada para áreas irrigadas e de sequeiro dos sertões da Bahia, Pernambuco e Piauí, devido suas boas características de adaptabilidade para essas regiões (Santos, 2011). Segundo Bastos e colaboradores (2016), aumentar a eficiência das plantações, considerando previamente os aspectos econômicos e ambientais, contribui na diminuição do uso de insumos industriais que causam danos ambientais, proporcionando menores impactos aos recursos naturais.

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) desempenha um papel importante na manutenção das culturas nas regiões semiáridas, principalmente para o feijão, uma leguminosa bastante dependente de nitrogênio, durante o seu ciclo (Mesquita *et al.*, 2023). O uso dessa tecnologia, através de estirpes de bactérias eficientes é uma forma de aumentar a produtividade e melhorar a renda para o agricultor (Oliveira *et al.*, 2017). Além disso, a inoculação pode reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, que encarecem a produção, sendo ainda poluentes ao meio ambiente (Robertson; Vitousek, 2009).

O nitrogênio é um nutriente que faz parte dos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas sendo determinante para o desenvolvimento das mesmas (Büll e Cantarella, 1993). Na

atmosfera, encontra-se em abundância na forma gasosa (Costa Neto, 2016). No entanto, no solo apenas 2% está disponível em forma de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), no qual o elemento fica disponibilizado apenas por processo de FBN ou adubação nitrogenada (Menezes, 2019). Em áreas onde a adubação não é realizada e as sementes não são inoculadas, a absorção de nitrogênio depende da simbiose com rizóbios nativos, podendo apresentar baixa eficiência na fixação (Mesquita *et al.*, 2023).

Na década de 1970, pesquisadores e empresas perceberam os benefícios da inoculação com rizóbios. Contudo, apesar de diversos trabalhos comprovando esses benefícios, as pesquisas avançavam em ritmo lento. Até que, em dias atuais, devido ao aumento da procura por alimento, é notória a escalada em estudos que visam obter o desenvolvimento de novos inoculantes cada vez mais eficazes para uma agricultura livre de agroquímicos (Santos, Nogueira e Hungria, 2019). Nesse sentido, a inoculação antecedente ao plantio é uma realidade preconizada, visto que os solos agrícolas apresentam carência em bactérias eficientes para realização da fixação de nitrogênio (Döbereiner, 1966), principalmente aquelas áreas que não tiveram uma boa atenção no cuidado com o manejo.

As bactérias conhecidas como *rizóbios*, realizam fixação simbiótica do nitrogênio em associação com leguminosas. Após a infecção por essas bactérias, a planta hospedeira apresenta um aumento e aceleração no ritmo de divisão celular, formando estruturas chamadas de nódulos no sistema radicular (Pelczar, Reid e Chan, 1916). As bactérias tornam o nitrogênio atmosférico disponível para a planta (Moreira e Siqueira, 2006), que por sua vez, se beneficiam dos exsudatos liberados pelos tecidos vegetais. Embora, não se trate de uma associação obrigatória. (Pelczar, Reid e Chan, 1916).

É importante destacar que existem especificidades e influências por fatores edafoclimáticos entre os dois componentes, *Rhizobium* e leguminosa, podendo apresentar mecanismos de ação diferentes. Por isso, espécies de *Rhizobium* eficazes para um grupo de leguminosas podem ser menos ou totalmente ineficaz para outros grupos. (Dabessa *et al.*, 2018; do Amorim *et al.*, 2019)

Diante do aspecto de melhoria no crescimento vegetal, duas estirpes de *Azospirillum brasilense* foram selecionadas pela Embrapa Soja, para fabricação de inoculantes, sendo denominadas de Ab-V5 e Ab-V6 (Hungria, 2011). O *A. brasilense* pertence a um gênero de Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCV), com capacidade de colonizar mais de cem espécies de plantas, contribuindo para a produtividade no campo, fixando nitrogênio endofiticamente, em diversas espécies de monocotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas,

arbustivas e arbóreas (Cubillos Hinojosa, 2020; Moreira, 2002). Além disso, esses microrganismos têm entre seus benefícios, a capacidade de produzir fitohormônios (ácido indolacético, giberilina, citocina, entre outros) que proporcionam crescimento radicular e o ganho em biomassa, (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018).

A técnica da co-inoculação, consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, (Bárbaro *et al.*, 2009). Estudos relatam resultados de anos, demonstrando a tecnologia de co-inoculação para agricultores na soja, percebendo aumentos significativos de nodulação e rendimento de grãos (Prando *et al.*, 2024). Nesse sentido, o Brasil persiste em aproveitar a FBN e co-inoculação para atender às necessidades de Nitrogênio (Hungria e Nogueira, 2022).

A efetividade da co-inoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum* e seus respectivos efeitos, já tem sido demonstrado sobre o desenvolvimento nodular em feijão, (Okon e Kapulnik, 1986). Hungria *et al.* (2013) demonstraram que a associação de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* melhora o rendimento de grãos de soja, sem adição de fertilizantes nitrogenados. Além disso, Remans *et al.* (2008) e Yadegari *et al.* (2010) também afirmam que o potencial para aumentar a nodulação e o desenvolvimento de plantas, tem sido verificado com a inoculação conjunta de *Rhizobium* e *Azospirillum* em plantas de feijão. (De Souza e Simonetti, 2019). Segundo Chaparro *et al.* (2012) e Hungria *et al.* (2013), a co-inoculação com ambos os microrganismos pode melhorar o desempenho da planta, estimulando a formação de células epidérmicas que contribuem para a fixação do nitrogênio e conseqüente elevação do acúmulo de N nos tecidos da planta.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da co-inoculação das bactérias pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* spp e *Azospirillum brasilense* na promoção do crescimento das plantas de feijão-caupí.

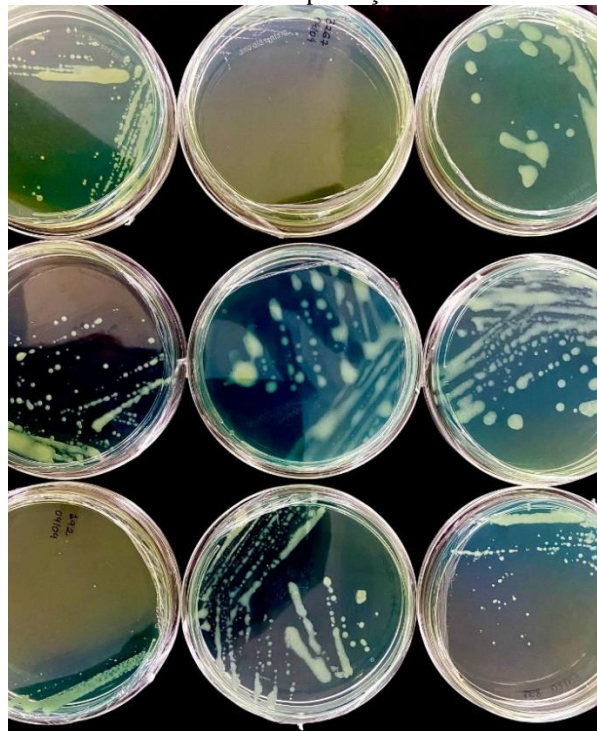
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em casa de vegetação coberta por tela, do tipo sombrite de 70% de sombreamento, pertencente ao Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – DTCS, na Universidade do Estado da Bahia – UNEB, *Campus* III, situada no município de Juazeiro – BA, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: Lat. 9°25'12.87" S; Long. 40° 29' 13.30" W. De acordo com a classificação climática de Köppen, a região apresenta clima do tipo BSW<sup>h</sup>, semiárido, ou seja, clima tropical quente e seco.

No trabalho foram utilizadas estirpes de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) *Bradyrhizobium* spp e *A. brasilense*, as estirpes de *Bradyrhizobium* spp (Figura1) foram ativadas no Laboratório de Microbiologia do Solo (LAMISO), que fica localizado também no *campus* III da UNEB. Sendo utilizados os seguintes isolados de *Bradyrhizobium* spp: BR 3262, BR 3267 (Rumjanek, 2006; Zilli 2008) e as estirpes ESA 168; ESA 192; ESA 370; ESA 377; ESA 378; ESA 380; isoladas por (Sena, 2018). As cepas da bactéria *A. brasilense* foram obtidas, utilizando um inoculante comercial líquido, Azzofix®, contendo cepas AbV5 e AbV6.

**Figura 1.** Crescimento das bactérias *Bradyrhizobium* spp em meio de cultura YMA para posteriormente serem usadas na produção dos inoculantes



**Fonte:** Autoria própria (2024)

## 2.2. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O trabalho experimental foi desenvolvido do mês de abril ao mês de junho de 2024. Inicialmente as estirpes de *Bradyrhizobium* foram cultivadas por 7 dias em meio Yest Malt Agar (YMA), (Fred e Waksman, 1928) à 28°C (figura 2A), com a respectiva composição: 10g de Manitol; 0,5g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1g de NaCl; 0,5g de Extrato de levedura; 5 ml de Azul de Bromothimol a 0,5%; 15 g de ágar). Após o crescimento dos isolados, estes foram novamente cultivados em erlenmeyers, sobre agitador orbital, contendo meio YM para a produção dos inoculantes, durante 5 dias em 180rpm em temperatura ambiente (figura 2B).

**Figura 2.** A- Cultivo das bactérias *Bradyrhizobium* spp em placas de Petri dentro da BOD; B- Erlenmeyers em agitador orbital em preparo dos inoculantes.



Fonte: Autoria própria (2024)

O experimento foi realizado em vasos com capacidade de 5 litros, inicialmente foi colocado 1,0Kg de brita (Figura 3A), para facilitar a drenagem do excesso de água e permitir umidade adequada às plantas. Em seguida, foi adicionado o solo na quantidade aproximada de 4 Kg, completando a área superficial do recipiente de cultivo (Figura 3B). O solo utilizado é proveniente de uma área de pivô central desativada e sem cultivo, situada no próprio *Campus* da Universidade, com classificação de Neossolo Flúvico. Após a coleta do solo, uma amostra foi enviada para laboratório afim de se obter as informações dos atributos químicos do mesmo (tabela 1).

**Figura 3. Imagem A** - Pesagem das britas colocadas no fundo do vaso para melhorar na drenagem da água de irrigação (peso do vaso não foi considerado); **Imagem B** - Preenchimento dos vasos com solo, mediante pesagem para completar a área superficial do recipiente de cultivo.



Fonte: Autoria própria (2024)

**Figura 4.** Irrigação dos vasos do experimento utilizando proveta graduada para controlar a quantidade de água a ser aplicada.



Fonte: Autoria própria (2024)

Para a irrigação foi recorrida a lâmina de 100%, utilizando o método de lisimetria de pesagem para determinar quantidade de água a ser aplicada. A adubação referente ao tratamento com aplicação de nitrogênio – Controle Nitrogenado (CN), aconteceu com dois dias de antecedência da semeadura, foi realizada de acordo com as recomendações de adubação para o

estado de Pernambuco: 2ª aproximação, utilizando como parâmetros os resultados da análise de solo realizada com antecedência (Tabela1). As sementes foram obtidas do estoque de sementes do Laboratório de Microbiologia do Solo (LAMISO - UNEB). A seleção das sementes se deu através do processo de separação manual, onde eram selecionadas as sementes com melhor aparência física, sendo retirados sementes furadas, quebradas ou com manchas (figura 5). A semeadura foi realizada, adotando-se 3 sementes (plantas) por vaso, da variedade de feijão-caupí, BRS Acauã.

**Tabela 1** – Resultado da análise química do solo da área do pivô central UNEB utilizado no trabalho

Profundidade	pH	MO	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H+Al	SB	CTC
cm	H <sub>2</sub> O	g.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	----- cmolc.dm <sup>-3</sup> -----					
0 - 20	6,2	5	7,6	0,17	1,6	0,37	0,48	2,15	2,15

Fonte: Autoria própria (2024)

**Figura 5.** Seleção das sementes, processo de separação manual para retirada das sementes inviáveis para uso no trabalho.



Fonte: Autoria própria (2024)

Antes do plantio, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2%) por 5 minutos e lavagens sucessivas com água destilada até a retirada completa de resíduos. Após desinfestadas e secas, as mesmas foram inoculadas em uma proporção de 1 ml do inoculante por semente, pelo método da microbiolização, em um tempo de 30 minutos (figura 6).

**Figura 6.** Sementes de feijão caupí submergidas em inoculantes e co-inoculantes



Fonte: Autoria própria (2024)

Com 7 dias após a emergência (DAE), foi realizado desbaste das plantas de feijão, afim de se deixar apenas duas plantas por vaso, levando em consideração as plantas mais vigorosas. No mesmo período foi efetuada a re-inoculação com as bactérias *Bradyrhizobium* spp e *Azospirillum brasilense* no solo próximo ao colo das plantas. Este procedimento foi realizado com o objetivo de aumentar a concentração dessas bactérias na área da rizosfera, promovendo assim um ambiente mais favorável para crescimento microbiano e o desenvolvimento das plantas.

**Figura 7.** Processo de desbaste e de reinoculação das bactérias com 7 dias após a emergência (DAE); A- antes do desbaste; B- após o desbaste; C- Processo de reinoculação das bactérias na região do colo das plantas.



Fonte: Autoria própria (2024)

### 2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com 13 tratamentos e 04 repetições. Os tratamentos são os seguintes: T01 = Controle Absoluto; T02 = Controle nitrogenado; T03 = *A. brasilense*; T04 = *Bradyrhizobium* (estirpe BR 3262); T05 = *Bradyrhizobium* (estirpe BR 3267); T06 = *Bradyrhizobium* (estirpe BR 3262) + *A. brasilense*; T07 = *Bradyrhizobium* (estirpe BR 3267) + *A. brasilense*; T08 = ESA 168 + *A. brasilense*; T09 = ESA 192 + *A. brasilense*; T10 = ESA 370 + *A. brasilense*; T11 = ESA 377 + *A. brasilense*; T12 = ESA 378 + *A. brasilense*; T13 = ESA 380 + *A. brasilense*.

### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos 30 dias após a semeadura realizou a coleta do experimento e a retirada do mesmo da casa de vegetação, foram feitas mensurações biométricas, como parâmetros de crescimento das plantas do feijão caupi: altura das plantas; massa fresca e seca das raízes; massa fresca e seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos. Os dados de clorofila A e B foram coletados em dois momentos durante o experimento, a primeira coleta aos 15 dias após a emergência (15 DAE) e a segunda coleta aos 30 dias após a emergência (30 DAE) com o auxílio do equipamento ClorofiLOG Falker®. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e interpretados por meio de análise de variância (teste F), teste de comparação de média de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se a versão do programa computacional *Software Agroestat* para o sistema operacional Windows (Ferreira, 2019).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Os tratamentos foram comparados com um controle nitrogenado e um controle absoluto, isento de inoculações e adubação nitrogenada. Dessa forma, os resultados indicaram variações significativas em alguns parâmetros, enquanto outros não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2). As variações nas respostas dos tratamentos controle, inoculação e co-inoculação no feijão caupi, em diferentes parâmetros, apontam que algumas estirpes podem ter sido altamente competitivas com os rizóbios nativos daquele solo. (Perez *et al.*, 1993; Longatti *et al.*, 2013)

As análises de comprimento da parte aérea, massa fresca da parte aérea e comprimento das raízes revelaram que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Embora seja importante mencionar que alguns tratamentos inoculados ou co-inoculados com as bactérias utilizadas no trabalho mostraram o mesmo padrão de resposta estatística que a testemunha adubada, apresentando-se como um potencial positivo com semelhança ao uso de adubação química nitrogenada. Ou seja, nas condições em que foi realizado o presente trabalho, o uso de inoculantes e a co-inoculação com algumas das estirpes de *Bradyrhizobium* em associação com *A. brasilense* na cultura do feijão caupí, diminuiria o custo de produção e impactos ambientais associados ao uso de fertilizantes químicos, sendo considerado uma técnica mais sustentável e com menor impacto ambiental.

### 3.1.1. Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa Fresca da Parte Aérea (MFPA)

Os resultados de comprimento da parte aérea demonstraram que não houve diferença significativa (NS) entre os tratamentos. Porém há uma observação importante a se considerar, é que para o comprimento da parte aérea das plantas os tratamentos *A. brasilense*, (BR 3262 + *A. brasilense*), (ESA 192 + *A. brasilense*) e (ESA 377 + *A. brasilense*), apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação aos demais tratamentos, tiveram médias superiores ao controle nitrogenado (CN). Além disso, todos os tratamentos mostraram médias superiores controle absoluto (CA), indicando que qualquer tratamento aplicado resultou em um crescimento melhor da parte aérea em comparação com a ausência do uso da inoculação e co-inoculação das bactérias.

**Figura 8.** Desenvolvimento da parte aérea das plantas de feijão, sob diferentes tratamentos nas condições do experimento.



Fonte: Autoria própria (2024)

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira e colaboradores (2020), em seu estudo sobre co-inoculação e uso de nitrogênio em cobertura na cultura da soja, onde observou que, a altura de plantas de soja não foi influenciada pelos tratamentos constituídos pela

combinação entre inoculantes (*Bradyrhizobium japonicum*; *Azospirillum brasilense*; *B. japonicum* + *A. brasilense* e controle sem inoculação) e quatro níveis de nitrogênio em cobertura na soja. Em contrapartida os resultados diferem dos resultados da pesquisa realizada por Schossler *et al.* (2016), onde foram observadas diferenças significativas para a altura do feijoeiro, nos tratamentos com inoculação utilizando apenas *R. tropici* e co-inoculação com *R. tropici* + *A. brasilense* apresentou maior estatura em relação ao controle.

Para massa fresca da parte aérea, não houve diferença significativa. Além disso, os tratamentos BR 3262 e (ESA 378 + *A. brasilense*), obtiveram resultados inferiores ao CA e não se diferem significativamente dos outros tratamentos. Os resultados de massa fresca corroboram com os resultados encontrados por Costa *et al.* (2019), no seu estudo sobre o desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. O trabalho afirma que, quanto aos atributos da parte aérea das plantas, a fitomassa fresca não apresentou diferença significativa entre as dosagens de inoculantes testadas para as cultivares M8210 aos 30 DAS e TMG132 aos 45 dias após a semeadura.

### 3.1.2. Massa Seca Da Parte Aérea (MSPA)

A análise de massa seca da parte aérea indicou que os tratamentos *A. brasilense*, CN, BR 3262 + *A. brasilense*, ESA 168 + *A. brasilense*, ESA 192 + *A. brasilense*, ESA 377 + *A. brasilense* e ESA 380 + *A. brasilense* foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores aos demais tratamentos. Vale ainda ressaltar que, o tratamento *A. brasilense*, apesar de ser estatisticamente semelhante a todos os tratamentos, foi o único a apresentar um resultado superior ao CN.

Contrário a esses resultados, Steiner, Ferreira e Zuffo (2019) em um estudo sobre a co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* no aumento da nodulação e o rendimento de grãos do feijoeiro, verificou que, a inoculação com *R. tropici* e *A. Brasilense* isoladamente ou em combinação resultou no maior acúmulo de matéria seca na parte aérea e nas raízes em comparação com plantas não inoculadas. Resultados encontrados por Cunha *et al.* (2023), realizaram um estudo com a inoculação, co-inoculação e adubação nitrogenada na cultura da soja, e observaram que a massa seca da parte aérea, para o tratamento sem inoculação, aumentou conforme o aumento linear da dose de N aplicada. Ou seja, para os autores, a inoculação com as bactérias diazotróficas não interferiram no acréscimo da massa seca da parte aérea, diferindo dos resultados mostrados no presente estudo.

Os tratamentos CA, BR 3262, BR 3267, BR 3267 + *A. brasilense*, ESA 370 + *A. brasilense* e ESA 378 + *A. brasilense* foram também estatisticamente semelhantes entre si, mas inferiores ao grupo anteriormente mencionado (*A. brasilense*, CN, BR 3262 + *A. brasilense*, ESA 168 + *A. brasilense*, ESA 192 + *A. brasilense*, ESA 377 + *A. brasilense* e ESA 380 + *A. brasilense*). Além disso, os tratamentos BR 3262, BR 3267 e ESA 378 + *A. brasilense* embora semelhantes estatisticamente aos outros tratamentos, tiveram resultados inferiores ao CA.

### 3.1.3. Comprimento Da Raiz (CR)

Para o comprimento da raiz, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa, o CN destacou-se por obter médias de resultados superiores a todos os demais tratamentos, seguidos dos tratamentos de inoculação com as bactérias BR 3262 e BR 3267. Os tratamentos com co-inoculação, ESA 377 + *A. brasilense* e ESA 378 + *A. brasilense*, embora estatisticamente semelhantes, foram superiores ao CA.

**Figura 9.** Desenvolvimento das raízes, sob diferentes tratamentos conforme condições do experimento



Fonte: Autoria própria (2024)

Cunha *et al.* (2023) em seu trabalho com inoculação, co-inoculação e adubação nitrogenada na cultura da soja, trouxe resultados demonstrando que a inoculação de *A. brasilense* na cultura da soja, foi possível observar interação significativa com a influência dessa bactéria sobre o crescimento das raízes de soja. Este resultado pode reforçar que além da FBN, a produção de fitormônios pode ter influenciado o crescimento de raízes. Bulegon *et al.* (2014) com o propósito de avaliarem o desempenho de *B. japonicum* e *A. brasilense*, de forma isolada e co-inoculadas na germinação e desenvolvimento inicial de diferentes cultivares de soja cultivadas na região Oeste do Paraná, concluíram em seus estudos em condições laboratoriais que a co-inoculação não se mostrou eficiente frente à inoculação isolada das respectivas bactérias, em relação às cultivares testadas. Esses resultados sugerem que o uso de dois microrganismos simultâneos pode acarretar competição entre ambos, sem alcançar a eficiência com a co-inoculação para alguns aspectos de crescimento das plantas.

### 3.1.4. Massa Fresca das Raízes (MFR) e Massa Seca das Raízes (MSR)

Os dados sobre a massa fresca e seca das raízes mostraram uma alta significância estatística para o CN, sendo estatisticamente superior a todos os demais tratamentos. Todos os outros tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre si. É importante mencionar que para massa fresca das raízes, os tratamentos ESA 378 + *A. brasilense* e ESA 380 + *A. brasilense*, apesar de semelhantes ao CA, tiveram resultados inferiores.

Ao contrário dos resultados expostos no presente trabalho, Reis *et al* (2018) em seu estudo sobre, crescimento vegetativo do feijão-caupi com inoculante alternativo verificou que a massa seca das raízes do feijão caupi não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com inoculação alternativa, inoculação comercial e a testemunha absoluta que foram superiores aos demais tratamentos. Apesar dos tratamentos com inoculação e sem adubação nitrogenada não diferirem da testemunha, estes obtiveram valores absolutos maiores para massa seca das raízes. Ou seja, o uso de inoculantes proporcionou um maior incremento para a massa seca das raízes do feijão que o uso da adubação nitrogenada.

Com relação ao tratamento com a inoculação do *A. brasilense*, Reis *et al* (2018) observou resultados que também diferem dos resultados apresentados nesse estudo (tabela 2), ele verificou em seu trabalho que existe interação significativa, analisando a massa seca da raiz com tratamento com o inoculante *A. brasilense*, com doses de Nitrogênio. No entanto, Cunha (2023) no tratamento com a co-inoculação, a massa seca da raiz diminuiu conforme o aumento da dose de N aplicada. Isso significa que o N aplicado afetou o aumento da massa seca da raiz, onde diminuiu a ação das bactérias diazotróficas em associação e conseqüentemente diminuindo a atividade de FBN e crescimento radicular das plantas, logo, diminuição de massa seca da raiz.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância e coeficiente de variação. Tratamentos e respectivas bactérias inoculadas e co-inoculadas. CPA- Comprimento da Parte Aérea; MFPA- Massa Fresca da Parte Aérea; MSPA- Massa Seca da Parte Aérea; CR- Comprimento das Raízes; MFR- Massa Fresca das Raízes; MSR- Massa Seca das Raízes. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>CPA</b>	<b>MFPA</b>	<b>MSPA</b>	<b>CR</b>	<b>MFR</b>	<b>MSR</b>
<b>Controle absoluto</b>	43,50 a	23,68 a	4,94 b	28,50 a	12,17 b	2,11 b
<b>T1 - Controle nitrogenado</b>	59,87 a	28,36 a	6,58 a	35,50 a	25,04 a **	3,88 a **
<b>T2 - <i>A. brasilense</i></b>	67,00 a	31,16 a	6,60 a **	27,50 a	15,05 b	2,03 b
<b>T3 - BR 3262</b>	55,50 a	21,57 a	4,74 b	32,75 a	14,61 b	2,36 b
<b>T4 - BR 3267</b>	54,37 a	24,62 a	4,85 b	32,50 a	12,51 b	1,90 b
<b>T5 - BR 3262 + <i>A. brasilense</i></b>	65,62 a	27,62 a	6,23 a	28,25 a	13,20 b	1,56 b
<b>T6 - BR 3267 + <i>A. brasilense</i></b>	50,50 a	24,70 a	5,52 b	28,25 a	14,47 b	2,05 b
<b>T7 - ESA 168 + <i>A. brasilense</i></b>	51,00 a	28,58 a	6,40 a	25,25 a	14,99 b	2,54 b
<b>T8 - ESA 192 + <i>A. brasilense</i></b>	63,00 a	26,59 a	5,80 a	26,75 a	16,04 b	2,19 b
<b>T9 - ESA 370 + <i>A. brasilense</i></b>	58,87 a	26,47 a	4,95 b	28,25 a	13,94 b	1,82 b
<b>T10 - ESA 377 + <i>A. brasilense</i></b>	60,87 a	24,44 a	6,08 a	30,25 a	15,59 b	1,69 b
<b>T11 - ESA 378 + <i>A. brasilense</i></b>	53,37 a	21,89 a	4,80 b	28,75 a	11,06 b	1,24 b
<b>T12 - ESA 380 + <i>A. brasilense</i></b>	50,50 a	26,94 a	5,97 a	24,50 a	10,75 b	2,09 b
<b>CV (%)</b>	19,09	19,55	18,02	17,43	21,89	35,64

**Fonte:** Autoria própria (2024)

## 3.2. NODULAÇÃO

### 3.2.1. NÚMERO DE NÓDULOS

O número de nódulos apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (figura 11). Os tratamentos ESA 378 + *A. brasilense* e ESA 370 + *A. brasilense* destacaram-se por terem os melhores resultados. Por outro lado, o tratamento do controle absoluto (CA) foi estatisticamente semelhante aos dos tratamentos ESA 192 + *A. brasilense*, BR 3262 + *A. brasilense*, *A. brasilense*, BR 3267 e BR 3262.

Resultados semelhantes foram encontrados por Coelho (2021), em seu trabalho de inoculação e co-inoculação suplementar tardia com *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* como estratégias para aumento da nodulação e produtividade do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), demonstrando que a nodulação (número e massa seca dos nódulos), teve efeito negativo com a adubação em cobertura, diminuindo o NN e a MSN. Mesmo que a promoção de crescimento MSPA, N foliar tenha sido afetada positivamente com o fornecimento de nitrogênio em cobertura. Os dados de Steiner *et al.* (2019), em seu trabalho, também corroboram com os resultados deste presente estudo, trazendo resultados que demonstram que há diminuição ou inibição da nodulação no feijoeiro por meio do fornecimento de N mineral. Ou seja, o estímulo para iniciar o processo de nodulação no feijoeiro é dependente do teor de N mineral no solo e o aumento da disponibilidade desse nutriente pode inibir a formação e o crescimento dos nódulos. Esses resultados são bastantes elucidados na literatura.

**Figura 10.** Raiz da planta de feijão após lavagem com formação de nódulos

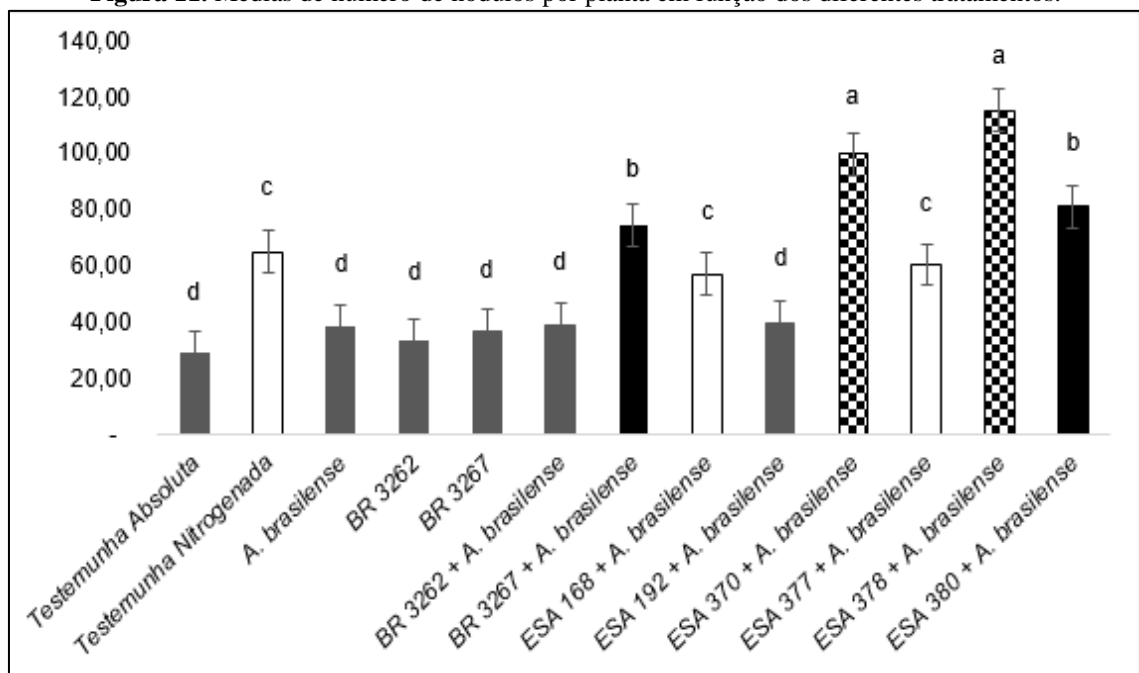


**Fonte:** Autoria própria (2024)

Com os resultados apresentados no presente estudo é possível, verificar que, apesar dos nódulos presentes (29,5 em média), nos controles absolutos esse tratamento apresentou os menores desempenhos na maioria dos parâmetros avaliados, principalmente comprimento da

parte aérea e número de nódulos, não diferindo estatisticamente de alguns tratamentos inoculados e co-inoculados. Como demonstraram Cardoso *et al.* (2012) que os nódulos presentes no controle absoluto podem estar ocupados, em sua maioria, por rizóbios nativos que podem ser pouco eficientes na obtenção de nitrogênio pelo processo de fixação biológica, comprometendo o potencial de FBN no feijoeiro. Além disso, a alta população de rizóbios nativos no solo, pode aumentar a competição com as estirpes inoculadas que pode consequentemente diminuir as respostas positivas da inoculação (Vargas; Mendes; Hungria, 2000).

**Figura 11.** Médias de número de nódulos por planta em função dos diferentes tratamentos.



Fonte: Autoria própria (2024)

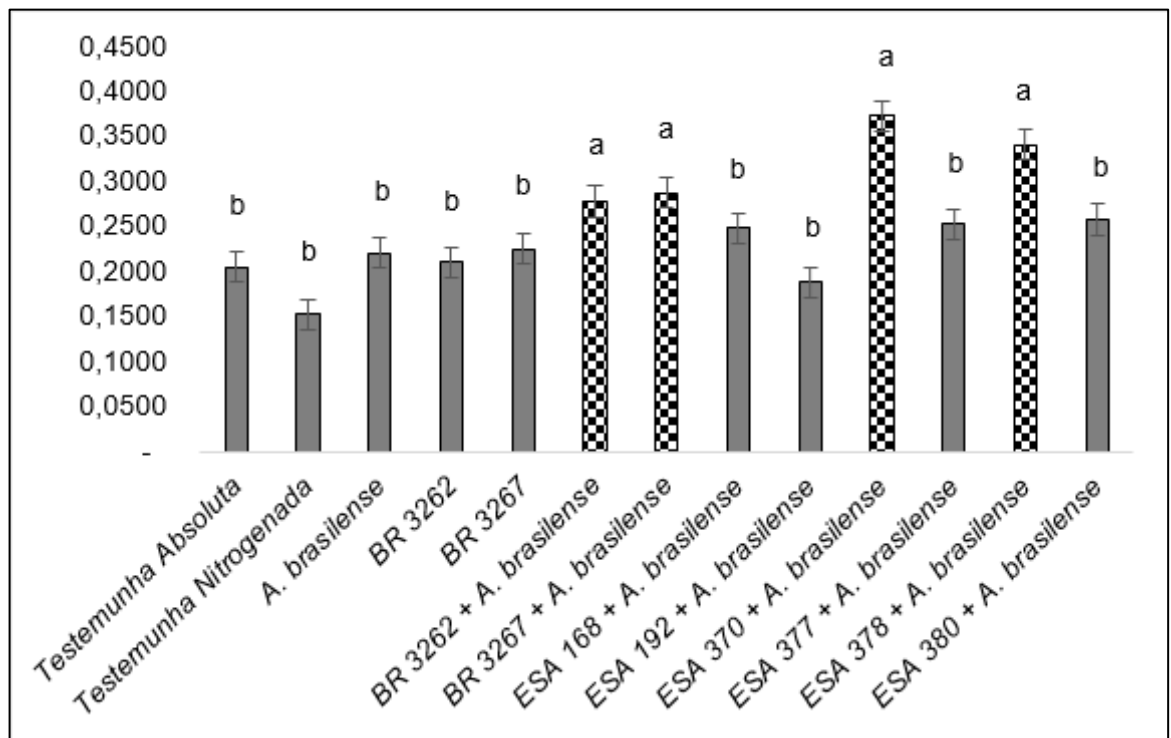
### 3.2.2. MASSA SECA DOS NÓDULOS

A massa seca dos nódulos (figura 12), também mostrou uma diferença altamente significativa entre os tratamentos. Os tratamentos ESA 370 + *A. brasilense*, ESA 378 + *A. brasilense*, BR 3267 + *A. brasilense* e BR 3262 + *A. brasilense* apresentaram os melhores resultados, sendo estatisticamente semelhantes entre si. Entretanto, o tratamento ESA 370 + *A. brasilense* destacou-se, apresentando a maior média de massa seca. Em contraste, o tratamento com aplicação de nitrogênio apresentou desempenho inferior em relação a massa seca dos nódulos, indicando sua ineficácia em promover o crescimento da biomassa dos nódulos.

Segundo Wasson *et al.* (2006) em seu trabalho que indica o silenciamento da via dos

flavonoides inibindo a formação de nódulos radiculares e impedindo a regulação do transporte de auxina pelos rizóbios demonstra os efeitos negativos da adição de fertilizantes nitrogenados na formação de nódulos nas leguminosas. Afirmado assim, o papel deste na inibição do metabolismo dos compostos fenólicos das plantas, especialmente a síntese e liberação de isoflavonóides pelas raízes das leguminosas. Isso já foi relatado em outros estudos, como por Eckardt, (2006), que os isoflavonóides liberados pelas raízes das leguminosas desempenham, inclusive, múltiplos papéis em diferentes estágios do processo de nodulação, especialmente porque atuam como quimioatraentes dos rizóbios que regulam a expressão dos genes nod.

**Figura 12.** Comparação das médias de massa seca dos nódulos em função dos diferentes tratamentos



Fonte: Autoria própria (2024)

O tratamento (ESA 370 + *A. brasilense*) e (ESA 378 + *A. brasilense*), demonstraram ser mais eficazes no número de nódulos e aumento da massa seca dos nódulos. Estes resultados demonstram que a co-inoculação dessas bactérias com *Azospirillum* apresentam melhorias nas plantas de feijão caupi, devido sua interação positiva e um efeito sinérgico. O controle absoluto (CA) e o tratamento CN mostraram ser os menos eficazes nos respectivos parâmetros.

Resultados semelhantes foram encontrado por Prando (2024), em seu estudo sobre benefícios da co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense*, validaram em larga escala com agricultores no Brasil, o aumento consistente no número de nódulos devido à co-inoculação. Portanto, corroborando com o presente trabalho e sendo positivo em comparação com o controle não inoculado, havendo diferença percentual no número de nódulos devido à co-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense*, em análise estatística confirmando um aumento significativo de 35% na nodulação.

### **3.3. PARÂMETROS DE CLOROFILA**

#### **3.3.1. Clorofila A e B 15 Dias Após A Emergência**

A análise da clorofila A, 15 dias após a emergência foi significativa (figura 14), havendo diferença estatística entre os tratamentos. O controle nitrogenado (CN) destacou-se, obtendo resultados superiores a todos os outros tratamentos, mesmo sendo estatisticamente semelhantes. Por outro lado, os tratamentos BR 3262 e BR 3267 + *A. brasilense* apresentaram resultados inferiores ao controle absoluto (CA). O tratamento BR 3267 + *A. brasilense* apresentou resultados menos eficaz, enquanto o tratamento ESA 168 + *A. brasilense* mostrou valores próximos aos do controle nitrogenado, indicando que pode contribuir para a síntese de clorofila. Em contrapartida, os tratamentos BR 3262 e BR 3267 + *A. brasilense*, que apresentaram valores inferiores à controle absoluto (CA), indicando que esses tratamentos não auxiliaram na produção de clorofila.

**Figura 13.** Análise de clorofila, com o auxílio do equipamento ClorofiLOG Falker®.

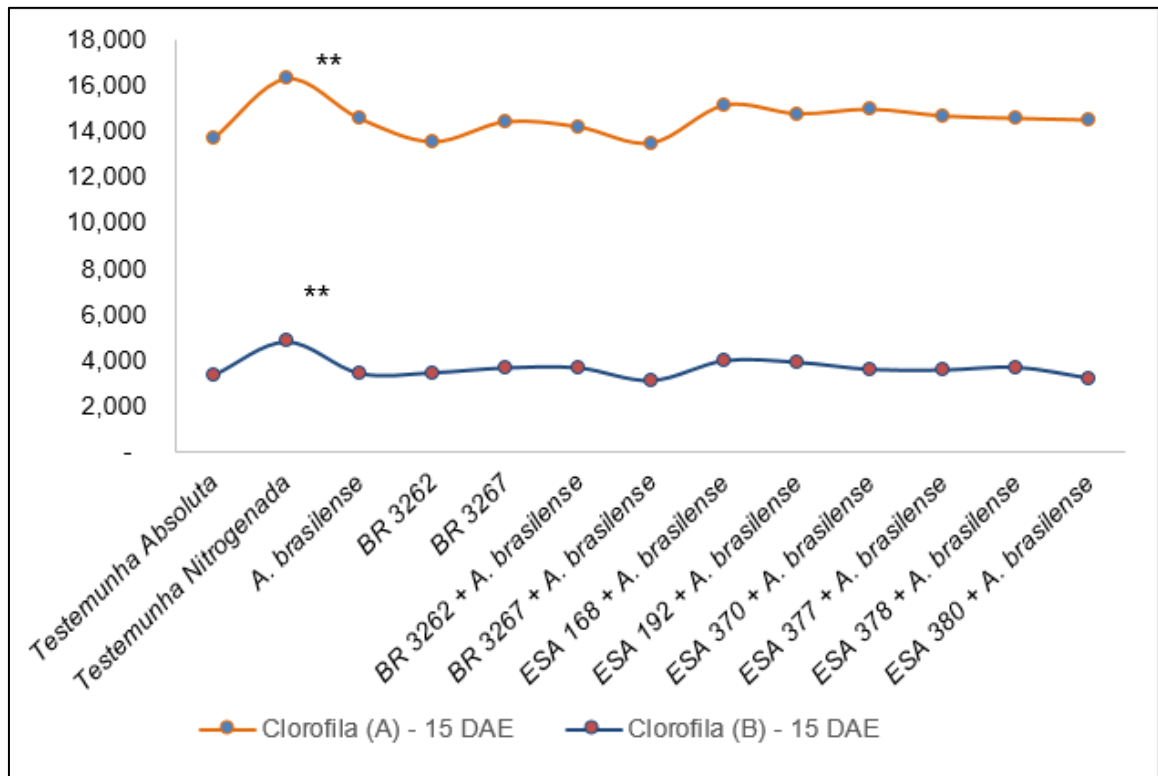


**Fonte:** Autoria própria (2024)

A análise da clorofila B, 15 dias após a emergência (figura 14), também foi significativa, seguindo uma tendência semelhante à da clorofila A, com o controle nitrogenado (CN) apresentando os melhores resultados. Os tratamentos ESA 380 + *A. brasilense* e BR 3267 + *A. brasilense*, com resultados inferiores à controle absoluto, passam a ideia de que esses tratamentos podem estar induzindo condições desfavoráveis ao desenvolvimento da planta. O tratamento BR 3267 + *A. brasilense*, apresentou resultados inferiores tanto para a clorofila A quanto para a clorofila B, destacando-se negativamente, sugerindo que pode haver um fator inibitório associado a esse tratamento (figura 14).

Sousa e Soratto (2012) investigaram a interação entre nitrogênio e sistemas de cultivo e relataram aumento nos níveis de clorofila em plantas de feijão com aplicação de fertilizantes nitrogenados. Dessa maneira, ele ainda reforça que esses resultados eram esperados porque o N é um elemento constituinte de muitos componentes das células vegetais, incluindo a molécula de clorofila. Portanto, com a maior disponibilidade desse nutriente no solo, maior nível de clorofila e concentração de N nas folhas.

**Figura 14.** Comparação das médias de Clorofila A e B aos 15 dias após a emergência (DAE)



Fonte: Leonilson Osvaldo da Silva (2024)

### 3.3.2. Clorofila (A) e (B) 30 Dias Após A Emergência

A clorofila (A) 30 dias após a emergência (figura 15), mostrou uma tendência diferente, mesmo não tendo diferença estatística significativa (NS) entre os tratamentos, o *A. brasilense* destacou-se com resultados superiores a todos os outros, seguido pelo controle absoluto (CA). Este resultado pode indicar que, a longo prazo, os benefícios do tratamento *A. brasilense* se tornam mais evidentes em termos de síntese de clorofila A.

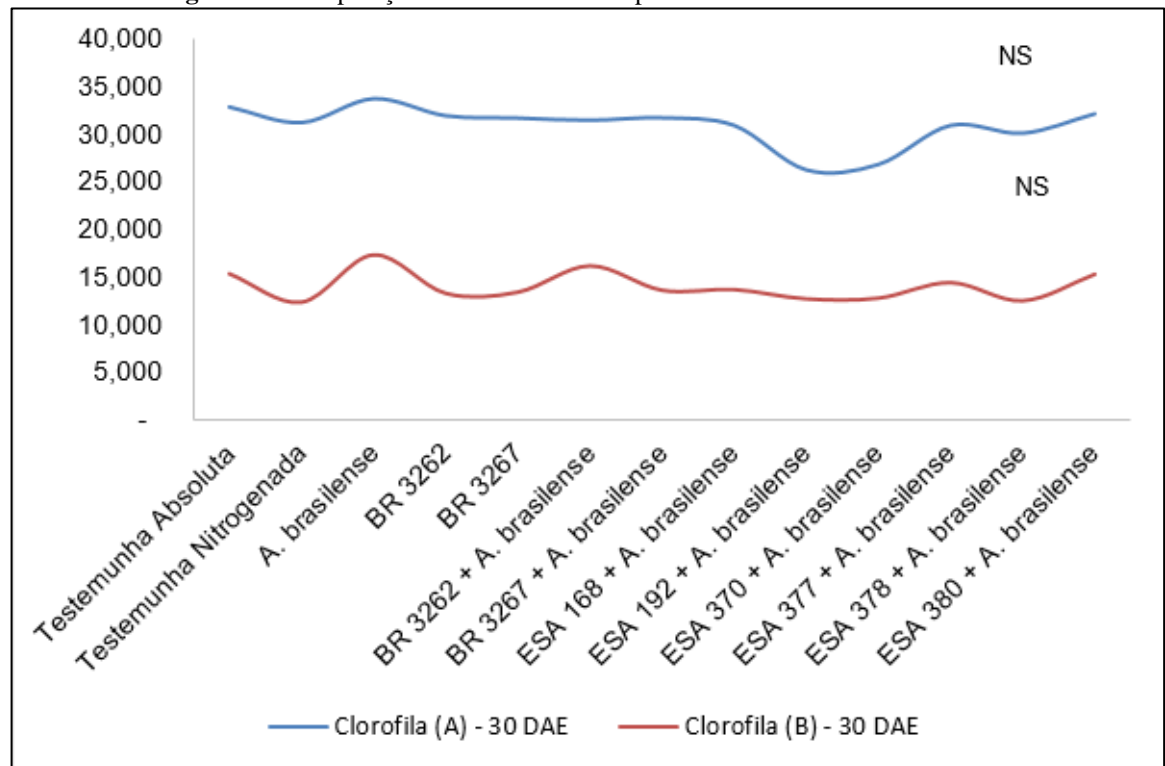
O controle absoluto (CA), apresentando o segundo melhor resultado sugere que, em ausência de qualquer tratamento, as plantas ainda conseguem manter níveis razoáveis de clorofila A, possivelmente devido a reservas internas de nutrientes. Os tratamentos ESA 377 + *A. brasilense*, ESA 168 + *A. brasilense*, ESA 378 + *A. brasilense*, ESA 370 + *A. brasilense* e ESA 192 + *A. brasilense*, que tiveram resultados inferiores ao controle nitrogenado (CN), indicam que esses tratamentos podem não ser eficazes a longo prazo para a manutenção dos níveis de clorofila.

A clorofila B 30 dias após a emergência (figura 15) reforçou a superioridade do tratamento *A. brasilense*, semelhante ao observado na clorofila A. Ou seja, a inoculação com

*A. brasilense* parece promover a síntese de clorofila de forma consistente ao longo do tempo, embora a análise não tenha mostrado diferença estatística significativa (NS) entre os tratamentos. O Controle nitrogenado (CN) teve uma eficácia inferior, apesar de ser estatisticamente semelhante aos demais tratamentos, isso sugere que, a longo prazo, o nitrogênio sozinho pode não ser suficiente para manter altos níveis de clorofila B (figura 15).

Contrário a esse estudo, Steiner (2019), em seu estudo com Co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* no aumento da nodulação em feijoeiro, demonstrou que o maior crescimento das plantas de feijoeiro promovido pela inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* resultou na maior diluição de N no tecido foliar das plantas, o que explica a ausência de efeito de inoculação na concentração de N e relativo índice de clorofila. Os resultados de clorofila A e B aos 30 dias após a emergência (DAE), corroboram com os resultados de Steiner (2019), onde seus resultados mostraram que a concentração de N nas folhas e o índice relativo de clorofila não foram significativamente afetados pela inoculação ou não inoculação das plantas com *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*.

**Figura 15.** Comparação das médias obtidas para Clorofila A e B aos 30 DAE



Fonte: Autoria própria (2024)

#### 4. CONCLUSÃO

A co-inoculação entre estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* pode promover maior eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em plantas de feijão-caupí cultivado em vasos com amostra de solo do Semiárido. Dessa forma, se faz necessário a instalação de novos experimentos, afim de investigar o potencial destas estirpes, a nível de eficiência agrônômica.

## 5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Mateus Ferreira; SIQUEIRA, Tânia da Silva; HENRIQUE, Jamiles Carvalho Gonçalves de Souza; CARVALHO, Lucas Henrique Maciel; DA SILVA, Monalisa Alves Diniz; SIMPLÍCIO, Josimar Bento. Fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi em resposta a inoculação com *Bradyrhizobium* e diferentes doses de molibdênio. **DELOS: Desarrollo Local Sostenible**, v. 16, n. 45, p. 1748-1759, 2023.

BÁRBARO, Ivana Marino; BRANCALIÃO, Sandro Roberto; TICELLI, Marcelo; MIGUEL Fernando Bergantini; SILVA, José Antonio Alberto da. **Técnica alternativa: co-inoculação de soja com Azospirillum e Bradyrhizobium visando incremento de produtividade.** Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm). Acesso em: 24 de abril de 2024.

BASTOS, Rennan do Amaral. **Co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal em feijoeiro comum.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ. 2016.

BERTOLDO, Juliano Garcia; PELISSER, Amanda; SILVA, Raquel Paz da; FAVRETO, Rodrigo; OLIVEIRA, Luciene Antunes Dias de. Alternativas na fertilização de feijão visando a reduzir a aplicação de N-ureia. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 348-355, 2015

BULEGON, Lucas Guilherme; KLEIN, J. ; RAMPIM, L. ; GUIMARAES, V. F. ; BATTISTUS, A. G. ; KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomy Scienci**. v.3 p. 26-37. 2014.

BÜLL, Leonardo Theodoro. Nutrição mineral do milho. In: BULL, Leonardo Theodoro; CANTARELLA, Heitor. (Eds.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.63-145.

CARDOSO, Juscélio Donizete; HUNGRIA, Mariangela; ANDRADE, Diva S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2035–2049, 2012. Acesso em: 19 abr. 2024.

CHAPARRO, Jacqueline; SHEFLIN, Amy M. ; MANTER, Daniel K ; VIVANCO, Jorge M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biol Fertil Soils**, v. 48, p.489-499, 2012

COELHO, Lucas Gabriel Ferreira. **Inoculação e co-inoculação suplementar tardia com *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* como estratégias para aumento da nodulação**

**e produtividade do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** 2021. 109f. dissertação de mestrado - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Brasília- DF. 2021

COSTA, Letícia Carolina; TAVANTI, Renan Francisco Rimoldi; TAVANTI, Tauan Rimoldi; PEREIRA, Cassiano Spaziani. Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *bacillus subtilis*. **Revista Nativa**, v. 7, n. 2, p. 126-132, 2019. Acesso em: 19 abr. 2024.

COSTA NETO, Vicente Paulo da. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense.** 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2016.

CONAB. Acompanhamento safra brasileira de grãos. Brasília, Safra 2023/24 - Sexto levantamento, p. 1-87, mar. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos> Acesso em: 15 mar. 2024.

CUBILLOS HINOJOSA, Juan Guillermo. **Aplicação conjunta de substâncias húmicas e co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* em leguminosas e gramíneas.** 2020

DO SOCORRO CUNHA, Letícia; JÚNIOR, José Barbosa Duarte; LANA, Maria do Carmo; RIBEIRO, Luane Laíse Oliveira; SHIMADA, Belmiro Saburo; RICHART, Alfredo; COSTA, Antonio Carlos Torres da; ROSA, Willian Bosquette. **Inoculation, co-inoculation and nitrogen fertilization in soybean culture: Inoculação, co-inoculação e adubação nitrogenada na cultura da soja.** **Concilium**, ISSN: 0010-5236 v. 23, n. 10, p. 454-472, 2023. DOI: 10.53660/CLM-1378-23F25A

DABESSA, Alemayehu; ABEBE, Zerihun; BEKELE, Solomon. Limitations and strategies to enhance biological nitrogen fixation in sub-humid tropics of Western Ethiopia. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 10, n. 7, p. 122-131, 2018.

DO AMORIM, Marineide Rodrigues; SILVA, Antonio Victor Cavalcante Rocha; ANTUNES, Jadson Emanuel Lopes; OLIVEIRA, Louise Melo de Souza; ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira. **Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava em solos de três estados do nordeste brasileiro.** In **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-8215, v. 15, n. 6, p. 11-20. 2019.

DÖBEREINER, Johanna. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357-365, 1966.

DE SOUZA, Samuel Lincon Silva; SIMONETTI, Ana Paula Morais Mourão. Inoculação e

coinoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum* na cultivar de feijão BRS FC 104. **Revista Cultivando o Saber**, p. 14-23, 2019.

ECKARDT, Nancy Ann. **The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula***. *The Plant Cell*, Norwich, v. 18, n. 7, p. 1539-1540, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Folheto**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <https://shorturl.at/bkGPS>. Acesso em: 08 abr. 2024.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian Journal of Biometrics**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FILGUEIRAS, Gisalda Carvalho. *et al.* Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, Jerri Edson; VILARINHO, Aloisio Alcantara; ALVES, José Maia Arcanojo. eds. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista, Embrapa Roraima, 2009. p.23-58.

FRED, Edwin Broun; WAKSMAN, Selman Abraham. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: **McGraw-Hill Book**, 1928. 145 p.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues. *et al.* **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. 2011.

FUKAMI, Josiane; CEREZINI, Paula; HUNGRIA, Mariângela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 4 maio 2018. Acesso em: 19 abr. 2024.

HUNGRIA, Mariângela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina- PR, 2011.

HUNGRIA, Mariângela; NOGUEIRA, Marco Antônio; ARAUJO, Ricardo Silva. Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: **XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, Londrina. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa, 2013. p.151-153.

HUNGRIA, Mariângela; NOGUEIRA, Marco Antônio. Fixação biológica do nitrogênio. In: **Meyer, M.C., Bueno, A.F., Mazaro, S.M., Silva, J.C. (Eds.), Bioinsumos na Cultura da Soja. Embrapa**, Brasília, p. 143–162. 2022

LANGE, Annete; MOREIRA, Fatima Maria de Souza. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 529-533, 2002.

LONGATTI, Sergio Matheus Orlandi. Evaluation of plant growth-promotion traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 11, p.948-959, 2013

MENEZES, Ana Paula Morais. **Crescimento e produção de alface em resposta a rizobactérias e nitrogênio**. 2019. 69 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Rio Branco, AC, 2019.

MESQUITA, Alessandro Carlos; SILVA, Kécio Emanuel Dos Santos; MARTINS, Lindete Miria Vieira; CONCEIÇÃO, Polyanna Barbosa da; CARVALHO, Raquel Nunes de. Feijão caupi inoculado com bactérias associadas à adubação nitrogenada no metabolismo e crescimento da planta. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 66, p. 1-13, 2023.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Osvaldo. Microbiologia e bioquímica do solo. **Lavras: UFLA**, 729p. 2006.

OKON, Yaacov; KAPULNIK, Yoram. Development and function of Azospirillum-inoculated roots. **Plant Soil**, v. 90, p.3-16, 1986.

OLIVEIRA, Ana Paula Santos; SOUSA, Cleiton Mateus; FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. Desempenho do feijoeiro-comum inoculado com rizóbio em resposta a diferentes plantas de cobertura e épocas de dessecação. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 30, n. 3, 2017.

OLIVEIRA, Luiz Anderson Abdalla de. *et al.* Coinoculation and use of nitrogen in coverage in soybean culture. **Research, Society and Development**, ISSN 2525-3409, v. 9, n. 9, 2020. Acesso em: 01 jul. 2024.

PELCZAR, Michael Joseph; REID, Roger Delbert; CHAN, Edwardo Chin Shiu. **MICROBIOLOGIA**. 2. ed. São Paulo: **McGraw-Hill do Brasil**, 1916. v.803 p. ISBN ISBN, 9686046658, 978968604665.

PERES, José Renato Rodrigues. *et al.* Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbios para soja em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas. V. 17, p.357-363, 1993.

PRANDO, André Mateus. *et al.* Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. **European Journal of Agronomy**, 2024. v.155, Article 127112. ISSN 1161-0301. 2024. Acesso em: 19 abr. 2024.

REIS, Victor Roberto Ribeiro. *et al.* Crescimento vegetativo do feijão-caupi com inoculante alternativo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** Pombal, PB

n.13, n 4, p. 466-471, 2018. Acesso em: 01 jul. 2024.

REMANS, Roseline; BEEBE, Steve; BLAIR, Matthew; MANRIQUE, German; TOVAR, Eduardo; RAO, Idupulapati; CROONENBORGHES, Anja; TORRES-GUTIERREZ, Roldan; EL-HOWEITY, Mohammed; MICHIELS, Jan; VANDERLEYDEN, Jos. **Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxinproducing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. *Plant Soil*, v.302, p.149-161, 2008.

ROBERTSON, George Philip; VITOUSEK, Peter Morrison. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual review of environment and resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.

RUMJANEK, Norm Gouvea; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B. NEVES, M. C. P. **Feijão-caupí tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante**. 2006.

SANTOS, Carlos Antônio Fernandes. **BRS Tapaihum, BRS Carijó e BRS Acauã: novas cultivares de feijão caupí para o vale do São Francisco**. 2011

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antônio; HUNGRIA, Mariângela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **Amb Express**, v. 9, n. 1, p. 205, 2019.

SCHOSSLER, J.H; MEERT L.; RIZZARDI, Diego; MICHALOVICZ, Leandro. Yield components and grain yield of common-bean submitted to the inoculation and co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* strains. ISSN 1983-2443 **Revista Scientia Agraria**. Curitiba v. 17 n. 1 p. 10-15, 2016.

SENA, Pâmela Thalita Souza. **Caracterização polifásica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupí em solos sob diferentes usos agrícolas do semiárido baiano**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologias e Ciências Sociais, *Campus III*, Juazeiro - BA. 2018

SOUZA, Emerson Freitas Cordova; SORATTO, Rogério Peres. Adubação nitrogenada no feijoeiro após milho safrinha consorciado com *Urochloa brizantha* e *Urochloa ruziziensis*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 2669-2680, 2012.

STEINER, Fábio; FERREIRA, Helen Cristina Pereira. ZUFFO, Alan Mario. Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield? Semina: **Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 81–98, 2019. acesso em: 08 abr. 2024.

VARGAS, Milton. Antônio Teixeira; MENDES, Ieda Carvalho; HUNGRIA, Mariângela. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization in two cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 3, p. 228–233, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003740000240>

WASSON, Anton. Paul; PELLERONE, Flavia. I.; MATHESIUS, Ulrike. **Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia.** *The Plant Cell*, Norwich, v. 18, n. 7, p. 1617-1629, 2006.

YADEGARI, Mehrab; RAHMANI, H. Asadi; NOORMOHAMMADI, G.; AYNEBAND, A.. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Nutrition**, v.33, p.1733-1743, 2010.

ZILLI, Jerri Édson; XAVIER, Gustavo Ribeiro; RUMJANEK, Norm Gouvea. **BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a Inoculação de Feijão-Caupi em Roraima.** 2008.