

# SINERGISMO *Bacillus*, *Brevibacillus* E, OU, *Paenibacillus* NA SIMBIOSE *Bradyrhizobium*-CAUPI<sup>(1)</sup>

André Suêlto Tavares de Lima<sup>(2)</sup>, Maria do Carmo Silva Barreto<sup>(3)</sup>, Janete Magali Araújo<sup>(4)</sup>, Lucy Seldin<sup>(5)</sup>, Hélio Almeida Burity<sup>(6)</sup> & Márcia do Vale Barreto Figueiredo<sup>(7)</sup>

## RESUMO

O feijão-caupi *Vigna unguiculata* [L.] Walp. é a principal cultura de subsistência do semiárido brasileiro, sendo fonte de proteínas de baixo custo, notadamente, para populações carentes. A produção dessa cultura no Nordeste é baixa devido à não utilização de insumos agrícolas – entre eles, o fertilizante nitrogenado. Por outro lado, bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) vêm sendo estudadas, de forma a maximizar a fixação de N<sub>2</sub>, disponibilizar nutrientes como P ou fito-hormônios e inibir doenças. Os objetivos deste trabalho foram verificar a viabilidade da coinoculação das sementes de feijão-caupi usando *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*-caupi; caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato; e avaliar o sinergismo entre os microrganismos como alternativa para otimizar a FBN. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), utilizando o feijão-caupi cv. “IPA-206”. As estirpes utilizadas foram: *Bacillus* sp. – 449, 450, 451, 461 e ANBE 31; *B. cereus* – 440; *B. subtilis* – 438, 441, 454, 455 e 459; *B. pumilus* – 444, 445 e 448; *B. megaterium* – 462; *Brevibacillus brevis* – 447; *Paenibacillus brasilensis* – 24, 172 e 177; *P. graminis* – MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106; *P. polymyxa* – S21; e *P. durus* – RBN4. Os microrganismos não apresentaram capacidade para produzir AIA nem

---

<sup>(1)</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Recebido para publicação em janeiro de 2010 e aprovado em fevereiro de 2011.

<sup>(2)</sup> Mestrando do PPGCS, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife (PE). E-mail: andresueldo@ig.com.br

<sup>(3)</sup> Bolsista do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA/EMBRAPA. E-mail: mcsbarreto@gmail.com

<sup>(4)</sup> Professora do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – DA/UFPE. Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife (PE). E-mail: janetemagali@yahoo.com.br

<sup>(5)</sup> Professora do Departamento de Microbiologia Geral da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Av. Pedro Calmon 550, Cidade Universitária, CEP 21941-901 Rio de Janeiro (RJ). E-mail: lseldin@micro.ufrj.br

<sup>(6)</sup> Pesquisador do IPA/EMBRAPA. E-mail: helio.burity@pq.cnpq.br

<sup>(7)</sup> Pesquisadora do IPA/CARHP e Professora membro permanente do PPGCS-UFRPE. E-mail: mbarreto@elogica.com.br

**solubilizar fosfato. Ocorreu sinergismo das estirpes de *Bacillus* sp. (449) e *Bacillus pumilus* (444) coinoculadas com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) no feijão-caupi.**

**Termos de indexação: promoção de crescimento, solubilização de fosfato, *Vigna unguiculata*, AIA, nodulação.**

**SUMMARY: SYNERGISM OF *Bacillus*, *Brevibacillus* AND/OR *Paenibacillus* IN THE SYMBIOSIS OF *Bradyrhizobium*-COWPEA**

*Cowpea Vigna unguiculata [L.] Walp. is the main subsistence crop of the semi-arid region and a low-cost protein source, especially for poorer populations. The production of this crop in the Northeast is low due to the lack of agricultural inputs, among them, nitrogen fertilizer. Plant-growth promoting bacteria (BGPB) are being studied to maximize N<sub>2</sub> fixation, provide nutrients such as P or phytohormones and inhibit diseases. The objectives of this study were to verify the viability of co-inoculation of cowpea seeds with *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and/or *Bacillus* together with *Bradyrhizobium* on cowpea; characterize the strains for the production of indol acetic acid (IAA) and phosphate solubilization, as well as to evaluate the synergism among microorganisms as an alternative to optimize biological nitrogen fixation. The experiments were conducted in a laboratory and a greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), with cowpea cv. "IPA - 206" and the strains *Bacillus* sp. - 449, 450, 451, 461 and ANBE 31, *B. cereus* - 440, *B. subtilis* - 438, 441, 454, 455 and 459, *B. pumilus* - 444, 445 and 448, *B. megaterium* - 462 and *Brevibacillus brevis* - 447, *Paenibacillus brasiliensis* - 24, 172 and 177, *P. graminis* - 04.21 MC, MC 22:13 and 60,106 BR, *P. polymyxa* - S21 and *P. durus* - RBN4. No capacity to produce IAA or solubilize phosphate was observed in the microorganisms. Synergism was observed between the strains of *Bacillus* sp. (449) and *Bacillus pumilus* (444) co-inoculated with *Bradyrhizobium* on cowpea.*

*Index terms: growth promotion, phosphate solubilization, Vigna unguiculata, IAA, nodulation.*

## INTRODUÇÃO

O feijão-caupi tem grande importância nutricional, social, econômica e estratégica, com boas perspectivas no agronegócio brasileiro. Além disso, essa leguminosa tem a capacidade de interagir com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, o que pode contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (Soares, 2006), além de proporcionar uma agricultura mais sustentável (Moreira & Siqueira, 2006; Rodríguez et al., 2006). Além dos rizóbios, outras bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento (Mariano et al., 2004). A utilização desses microrganismos, denominados de BPCPs (bactérias promotoras de crescimento de plantas), visando à melhoria da produção agrícola será provavelmente uma das ferramentas mais importantes na atualidade. Diante do exposto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de se conhecer cada vez mais as potencialidades das BPCPs.

Rodríguez-Díaz et al. (2004), em estudo realizado na Antártica, encontraram três novas espécies de *Paenibacillus* (*P. cineris*, *P. cookii* e *P. wynnii*),

fixadoras de N<sub>2</sub>. Seldin (2008) relata que, das 89 espécies e duas subespécies de *Paenibacillus* descritas na literatura, 14 possuem estirpes com a capacidade de fixar o N<sub>2</sub>: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. peoriae*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. brasiliensis*, *P. durus*, *P. borealis*, *P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabiniae*, *P. zanthoxyli*, *P. donghaensis* e *P. forsythiae*. As BPCPs estimulam diretamente a fixação de N<sub>2</sub> (Han et al., 2005); assim, a coinoculação de rizóbio com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal tem mostrado potencial para aumentar o crescimento vegetal, a nodulação e a fixação de N<sub>2</sub> em várias leguminosas. A dupla inoculação com *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. ou *Paenibacillus* e estirpes de rizóbio apresentou efeito sinérgico na nodulação, crescimento das plantas, rendimento e captação ou fixação de N<sub>2</sub> nas culturas da soja, trevo, amendoim e feijão (Burns et al., 1981; Raverker & Konde, 1988; Burdman et al., 1997; Figueiredo et al., 2008a). Da mesma forma, a coinoculação de *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium* spp. melhorou a nodulação e fixação de N<sub>2</sub>, biomassa vegetal e produção de grãos em várias espécies de leguminosas, como alfafa (Bolton et al., 1990), soja (Dashti et al., 1998), feijão-mungo-verde (Sindhu et al., 1999) e grão-de-bico (Goel et al., 2002). A coinoculação com *Bacillus* spp. e *Rhizobium* ou

*Bradyrhizobium* spp. pode melhorar a nodulação e crescimento de plantas de feijão e soja, respectivamente (Srinivasan et al., 1997; Camacho et al., 2001; Bai et al., 2003). Os mecanismos utilizados pelas rizobactérias para promover nodulação e fixação de N<sub>2</sub> são, na sua maioria, desconhecidos ou permanecem ambíguos. Maior desenvolvimento radicular e absorção induzida de nutrientes pela BPCP e seus metabólitos (Lugtenberg et al., 2002; Persello-Cartieaux et al., 2003, Lacava et al., 2008), podem contribuir indiretamente para a nodulação e a fixação de N<sub>2</sub> (Vessey & Buss, 2002). Thilak et al. (2006) mostraram que a presença de *Pseudomonas putida* coinoculada com rizóbio aumentou a ocupação de nódulos na cultura do guandu. Evidências de maior efeito direto sobre a nodulação foram mostradas por Silva et al. (2007) e Figueiredo et al. (2008a).

Como exemplo dos efeitos benéficos de BPCPs na produção pode-se citar o aumento de até 37 % na produção e nodulação do amendoim com a inoculação de *Bacillus subtilis* (Turner & Backman, 1991). Li & Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja por meio da coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos. Essa contribuição foi relacionada com a produção de fito-hormônios, pectinase ou sinais moleculares, em *Bacillus cereus* (Halverson & Handelsman, 1991) e outras espécies de microrganismos (Dakora, 2003). Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela coinoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias (Stamford et al., 2003; Silva et al., 2007; Figueiredo et al., 2008a,b; Araújo, et al., 2010).

Sindhu et al. (2002), estudando a interação entre microrganismos, relatam que *Bacillus* sp. coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. melhora a nodulação e o crescimento das plantas de grama-verde (*Vigna radiate* [L.] Wilzeck.). A simbiose entre *Bradyrhizobium* e feijão-caupi, juntamente com as RPCP (Loutit (L) e LBF-410, estimula a nodulação e pode promover melhor eficiência na fixação do N<sub>2</sub> (Silva, 2007). Gomes et al. (2003), testando inoculação de *Bacillus pumillus* e *B. thuringiensis* subvar. kenya em mudas de alface, observaram incremento na matéria fresca da parte aérea e raiz por estas bactérias; em estudo *in vitro*, estes autores não encontraram nenhuma bactéria capaz de produzir AIA ou solubilizar fósforo, sugerindo que esses mecanismos não foram responsáveis pela promoção de crescimento nas plantas. Estudos desenvolvidos por Cardoso (1999) mostram que para um microrganismo ser denominado de BPCP só precisa ter atuação positiva no desenvolvimento e na produção vegetal, que pode ser resultado de vários mecanismos fisiológicos, como da produção de hormônios. Segundo Min-Ryu et al. (2005) e Araújo (2008), o modo de ação e a própria ocorrência do benefício de BPCPs variam com a espécie de planta e, ou, bactéria. Por isso, são necessários estudos para o reconhecimento de mecanismos de ação das bactérias

promotoras de crescimento em plantas, os quais definirão a melhor utilização dos isolados para cada interação planta-bactéria.

Outro benefício das BPCPs é sua capacidade de solubilizar nutrientes (Rodriguez & Fraga, 1999) como o P, que é de extrema importância para as plantas e que, apesar de ser abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica, é o nutriente mais limitante do crescimento vegetal em solos tropicais, devido à sua fixação no solo. Algumas BPCPs podem produzir hormônios de crescimento pela presença de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (Correa et al., 2004) e ácido indol acético (AIA) (Cattelan, 1999). A produção de AIA – um regulador de crescimento vegetal que aparentemente não funciona como hormônio em células bacterianas – pode ter evoluído em razão de sua importância na relação bactéria-planta. Esse regulador, quando secretado por bactérias em baixas concentrações, pode promover o crescimento da raiz diretamente pela estimulação da alongação da célula ou divisão celular (Sobral, 2003). Indiretamente, as BPCPs podem auxiliar no crescimento da planta, promovendo antagonismo a fungos patogênicos (reduzindo ou substituindo totalmente o uso de pesticidas químicos), e na produção de sideróforos, quitinase, β-1,3-glucanase, antibióticos, pigmentos fluorescentes e cianetos (Renwick et al., 1991).

Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar as estirpes quanto à produção de ácido indol acético e solubilização de fósforo; verificar a viabilidade da coinoculação das sementes de feijão-caupi com *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*-caupi; e avaliar o sinergismo entre os microrganismos como alternativa para otimizar a FBN.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para os experimentos de laboratório (caracterização das estirpes quanto à produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fósforo) e casa de vegetação (viabilidade da coinoculação com BPCPs na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi) foram utilizadas estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus*, cedidas pela Coleção de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos – UFPEDA: *Bacillus* sp. – 449, 450, 451, 461 e ANBE 31; *B. cereus* – 440; *B. subtilis* – 438, 441, 454, 455 e 459; *B. pumilus* – 444, 445 e 448; *B. megaterium* – 462; e *Brevibacillus brevis* – 447. Com exceção da estirpe ANBE 31, que foi isolada na filosfera da leguminosa *Atriplex nummularia* L., todas demais foram isoladas do mosto de fermentação da cana-de-açúcar (oriundo de usinas da Zona da Mata de Pernambuco). As estirpes de *Paenibacillus* utilizadas foram cedidas pelo Instituto de Microbiologia da UFRJ: *Paenibacillus brasilensis* – 24, 172 e 177; *P. graminis* – MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106, isoladas da

rizosfera de milho (*Zea mays* L.) de um solo do Cerrado; *P. polymyxa* – S21, isolada no solo de Seropédica – RJ; e *P. durus* – RBN4, isolada em raízes de bananeira (*Musa* spp.)

As estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* foram crescidas em meio Caldo Nutriente (Nutrient broth – NB), e as de *Paenibacillus*, em meio Caldo de Tripticaseína de Soja (Trypticase soy broth – TSB) a 32 °C. A avaliação das bactérias quanto à produção do AIA e solubilização de fosfato foi realizada de acordo com métodos descritos por Cattelan (1999).

Para avaliação do AIA, as bactérias foram repicadas para placa contendo 1/10 TSB-ágar (*Paenibacillus*) ou NB-ágar (*Bacillus* e *Brevibacillus*) enriquecido com 5 mmol L<sup>-1</sup> de L-triptofano (1,021 g L<sup>-1</sup>). Foram testadas quatro estirpes por placa, em três repetições. Após a transferência, cobriu-se o meio com uma membrana de nitrocelulose de aproximadamente 9 cm de diâmetro e incubou-se a 28–30 °C por 24 h. Após esse período, as membranas foram removidas para outra placa e saturadas com a solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951) e incubadas em temperatura ambiente. As estirpes que formaram halo avermelhado na membrana, no período entre 30 min e 2 h, foram consideradas produtoras de AIA. Para o controle positivo, na produção do AIA foi utilizada a estirpe *Pantoea agglomerans* (601).

Na solubilização de fosfatos foi utilizado o meio 1/10 TSB-ágar ou NB-ágar, de acordo com a bactéria, acrescido de CaHPO<sub>4</sub> resultante da reação de 50 mL da solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,57 mol L<sup>-1</sup> e de 100 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 0,90 mol L<sup>-1</sup> adicionados a 850 mL de 1/10 TSA. As soluções e o meio foram autoclavados separadamente. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, estéril. Foi transferida uma estirpe por placa e incubada a 28–30 °C, por sete dias. As colônias que formaram halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfato. Para o controle positivo, na solubilização de fosfato foi utilizada a estirpe *Pseudomonas* sp. (234).

O experimento descrito foi conduzido no laboratório de biologia do solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 24 estirpes e, ou, isolados de BPCPs e uma bactéria controle, com três repetições.

Quanto ao experimento de viabilidade da coinoculação com *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi, utilizou-se a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) cedida pela Embrapa Agrobiologia – Seropédica – Km 47 – RJ, recomendada pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). As estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* utilizadas foram descritas anteriormente.

A estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) foi crescida em duplicata em erlenmeyers de 125 mL

contendo 25 mL de meio líquido (YM - manitol extrato de levedura (Vincent, 1970) a 250 rpm e 28 °C durante cinco dias. As estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* foram crescidas em meio Nutrient broth, e as de *Paenibacillus*, em meio Trypticase soy broth por 24–48 h (250 rpm; 32 °C). A concentração de bactérias foi de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* e de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para *Bradyrhizobium*.

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação do IPA, utilizando-se a cultivar de feijão-caupi “IPA – 206”. As sementes foram desinfestadas segundo método de Vincent (1970). A unidade experimental constituiu-se de potes de 1 L (vaso de Leonard); como substrato, utilizou-se areia + vermiculita (pH 6,8) na proporção de 2:1 autoclavado por uma hora, a 120 °C, a 101 kPa. Foram abertas sete covas com auxílio de um bastão de vidro. Primeiramente foi inoculado 1 mL do meio contendo *Bacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus* no solo em cada cova. Em seguida, para cada cova colocou-se uma semente e adicionou-se 1 mL do meio contendo *Bradyrhizobium*. Uma semana após semeadura, foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

A irrigação foi efetuada por capilaridade, utilizando a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme Silveira et al. (1998). A colheita foi realizada 40 dias após o plantio (DAP), avaliando-se: altura de plantas, comprimento da raiz, matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), relação MSPA/MSR, número de nódulos, tamanho de nódulos (pela expressão = MSN/Nº de nódulos), teor de N (pelo método de Kjeldahl segundo Bremner, 1965), N acumulado (Nac) na MSPA (pela expressão = MSPA x (%N/100) x 1000), eficiência da fixação de N<sub>2</sub> (pela expressão = Nac/MSN) e nodulação específica (pela expressão = Nº de nódulos/MSR).

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com 24 estirpes e, ou, isolados de BPCPs coinoculados com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), e um tratamento testemunha inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), totalizando 25 tratamentos com três repetições.

Os dados do segundo experimento foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.5 beta (Silva, 2008), com níveis de significância de 5 % pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma das estirpes testadas mostrou capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) ou solubilizar fosfato. Esses resultados estão de acordo com os de Hameeda et al. (2006), que, testando *Bacillus* (*B. licheniformis* (EB 13 e CDB 47) e *B. circulans* (EB

35), também não encontraram bactérias positivas em ambos os testes. Sobral (2003), estudando BPCPs endofíticas e epifíticas na cultura da soja, relatou que os grupos bacterianos mais frequentes, que apresentam produção de AIA e solubilização de P, são as *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae* – gêneros bem diferentes dos estudados neste trabalho. Mendonça (1995), avaliando algumas estirpes de *Bacillus* e *Brevibacillus* estudadas neste trabalho, encontrou resultados positivos quanto à produção de proteases. Assim, pode-se sugerir que em trabalhos futuros outros testes, como produção de quitinase, citocininas, giberelina, entre outros metabólicos, podem ser realizados a fim de encontrar bactérias com essas características. Apesar de ter trabalhado com diferentes gêneros e espécies de bactérias, Chen et al. (1996) informam que na maioria das pesquisas com BPCPs é empregado grande número de isoladas nas seleções preliminares, principalmente porque menos de 1 % das rizobactérias são capazes de promover crescimento em plantas.

Nos quadros 1 e 2 encontram-se os resultados obtidos para o experimento de viabilidade da inoculação com

*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. Não houve diferenças significativas para a altura das plantas (Quadro 1). Esses resultados discordam dos encontrados por Figueiredo et al. (2008b) e Pereira (2008), os quais observaram maior altura de plantas em tratamentos coinoculados. As plantas atingiram altura máxima de 184,5 cm, valor este bem superior ao descrito por Silva (2003), que foi de 156,7 cm aos 45 dias em estudo semelhante de inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001) com BPCPs.

Com relação ao comprimento da raiz (CR) (Quadro 1), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os tratamentos.

Os tratamentos *Bradyrhizobium* sp. coinoculado com *Bacillus* sp. (ANBE 31), *Paenibacillus brasiliensis* (24), *P. brasiliensis* (177), *P. durus* (RBN4) e *B. megaterium* (462) apresentaram maiores médias de MSPA (Quadro 1), porém não diferiram estatisticamente do tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* (testemunha), e sim do tratamento inoculação com *B. pumillus* (444). A inoculação com *B. pumillus* (444) reduziu a MSPA e, conseqüentemente, o N acumulado,

**Quadro 1. Altura da planta (AP), comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulo (MSN), relação MSPA/MSR e número de nódulos (Nº nód.) de plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* vs. *Bradyrhizobium* sp.**

Tratamento <sup>(1)</sup>	AP	CR	MSPA	MSR	MSN	MSPA/MSR	Nº nód.
	cm		g/vaso				nº/vaso
BR 3267 (B)	174,0a	23,0a	9,55a	1,25a	1,02ab	7,90a	206a
B + ANBE 31	159,0a	19,6a	9,53a	1,29a	1,08ab	8,49a	188a
B + 24	161,0a	18,0a	10,73a	1,45a	1,23a	7,42a	226a
B + 172	177,0a	18,0a	8,30ab	1,30a	1,10ab	6,35a	195a
B + 177	142,0a	17,8a	9,80a	1,33a	1,05ab	7,44a	131a
B + MC 04.21	173,3a	15,6a	7,39ab	1,07a	1,10ab	6,92a	176a
B + MC 22.13	148,3a	18,5a	7,97ab	1,21a	1,23a	6,54a	246a
B + BR 60106	170,0a	17,5a	9,14ab	1,33a	0,75ab	6,90a	242a
B + S21	175,6a	20,0a	8,22ab	1,09a	1,04ab	7,73a	171a
B + RBN4	184,5a	20,1a	10,00a	1,15a	0,86ab	9,10a	178a
B + 438	152,0a	16,5a	9,29ab	1,62a	1,24a	6,43a	176a
B + 440	145,3a	20,8a	7,85ab	1,18a	0,63ab	7,00a	97a
B + 441	157,5a	19,3a	8,99ab	0,98a	1,12ab	9,36a	139a
B + 444	127,0a	19,8a	5,56b	0,74a	0,59ab	7,71a	159a
B + 445	152,6a	19,6a	7,71ab	1,14a	0,92ab	6,83a	185a
B + 447	167,3a	20,0a	8,08ab	1,34a	0,81ab	6,39a	255a
B + 448	122,6a	16,0a	8,53ab	1,17a	1,08ab	8,12a	182a
B + 449	147,5a	17,0a	7,12ab	1,19a	0,44b	6,11a	178a
B + 450	157,0a	17,8a	8,28ab	1,30a	1,08ab	6,26a	193a
B + 451	176,0a	17,1a	8,79ab	1,29a	0,92ab	6,83a	160a
B + 454	156,0a	17,6a	9,23ab	1,30a	1,14ab	7,39a	185a
B + 455	136,0a	16,1a	7,46ab	0,85a	1,04ab	9,91a	199a
B + 459	144,0a	18,6a	8,83ab	1,26a	1,02ab	7,17a	145a
B + 461	167,6a	16,5a	7,92ab	1,10a	1,05ab	7,39a	143a
B + 462	171,6a	21,5a	9,61a	1,30a	1,10ab	7,36a	205a
CV (%)	18,04	16,22	13,89	27,54	22,88	25,71	17,71

<sup>(1)</sup> *Bacillus* sp. (449, 450, 451, 461 e ANBE 31), *B. cereus* (440), *B. subtilis* (438, 441, 454, 455 e 459), *B. pumilus* (444, 445 e 448), *B. megaterium* (462), *Brevibacillus brevis* (447), *Paenibacillus brasiliensis* (24, 172 e 177), *P. graminis* (MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106), *P. polymyxa* (S21) e *P. durus* (RBN4) vs *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) (B). Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5 % pelo teste de Tukey.

**Quadro 2. Teor de nitrogênio na matéria seca da parte aérea (Teor N), nitrogênio acumulado na MSPA (N ac), eficiência da fixação de N<sub>2</sub> (EFN<sub>2</sub>), nodulação específica (NE) e tamanho de nódulo (T nód) de plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* vs *Bradyrhizobium* sp.**

Tratamento <sup>(1)</sup>	Teor N	N <sub>ac</sub>	EFN <sub>2</sub>	NE	T nód.
	mg g <sup>-1</sup> /vaso	mg/vaso de N	mg g <sup>-1</sup> N na MSN	n° g <sup>-1</sup> de nódulo na MSR	g/nódulo
BR 3267 (B)	39,74a	379,66ab	403,39b	168,41a	5,10ab
B + ANBE 31	38,65a	385,09ab	415,73b	157,35a	5,60ab
B + 24	39,43a	423,40a	343,19b	155,22a	5,60ab
B + 172	37,17a	311,83ab	280,98b	153,25a	5,77ab
B + 177	33,67a	331,82ab	315,66b	96,49a	8,53ab
B + MC 04.21	39,51a	294,08ab	266,44b	167,35a	6,23ab
B + MC 22.13	37,49a	300,61ab	246,89b	202,39a	5,13ab
B + BR 60106	36,86a	332,78ab	460,00ab	180,29a	3,63ab
B + S21	40,44a	333,47ab	329,88b	163,18a	6,03ab
B + RBN4	37,57a	376,68ab	454,66ab	175,09a	6,60ab
B + 438	41,07a	382,27ab	323,51b	122,43a	7,00ab
B + 440	38,26a	299,10ab	519,20ab	86,23a	6,33ab
B + 441	39,51a	354,04ab	318,41b	142,59a	9,20a
B + 444	43,16a	241,98b	409,96b	222,91a	4,73ab
B + 445	42,31a	326,13ab	321,97b	161,29a	5,10ab
B + 447	39,97a	322,77ab	403,55b	201,41a	3,43ab
B + 448	38,89a	333,48ab	303,89b	189,82a	6,10ab
B + 449	39,12a	278,59ab	818,24a	144,95a	2,57b
B + 450	40,29a	333,63ab	310,73b	148,13a	5,90ab
B + 451	37,41a	331,41ab	370,93b	128,91a	5,90ab
B + 454	39,20a	362,00ab	318,93b	157,26a	6,73ab
B + 455	39,04a	291,30ab	279,92b	227,52a	6,30ab
B + 459	36,94a	326,94ab	319,86b	120,37a	7,10ab
B + 461	40,29a	317,03ab	308,68b	133,58a	7,53ab
B + 462	39,04a	375,17ab	340,62b	158,88a	5,57ab
CV (%)	8,09	15,15	32,11	44,80	34,29

<sup>(1)</sup> *Bacillus* sp. (449, 450, 451, 461 e ANBE 31), *B. cereus* (440), *B. subtilis* (438, 441, 454, 455 e 459), *B. pumilus* (444, 445 e 448), *B. megaterium* (462), *Brevibacillus brevis* (447), *Paenibacillus brasilensis* (24, 172 e 177), *P. graminis* (MC 04.21, MC 22.13 e BR 60106), *P. polymyxa* (S21) e *P. durus* (RBN4) vs *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) (B). Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5 % pelo teste de Tukey.

mas, quanto aos demais parâmetros, o tratamento (444) não diferiu da testemunha; assim, essa associação não prejudicou o processo de simbiose e fixação de N, sugerindo que outro efeito pode ter proporcionado essa redução na MSPA da planta.

A matéria seca da raiz dos tratamentos coinoculados não diferiu da testemunha, discordando dos achados de Araújo et al. (2010), que observaram maior MSR em tratamento coinoculado com *Bacillus subtilis*. No tocante à relação matéria seca da parte aérea/raiz (MSPA/MSR) (Quadro 1), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores de MSPA/MSR encontrados variaram de 6,11 a 9,91, concordando com os resultados de Figueiredo et al. (2008b), que obtiveram médias de 4,85 a 9,28.

Quanto ao número de nódulos (Quadro 1), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, concordando com os resultados de Figueiredo et al. (2008b) e discordando dos de Araújo et al. (2010), os quais constataram diferença de número de nódulos pela coinoculação com BPCPs em feijão-caupi.

No que se refere à matéria seca dos nódulos (MSN) nas plantas de feijão-caupi (Quadro 1), os tratamentos coinoculados com *Paenibacillus brasilensis* (24), *P. graminis* (MC 22.13) e *Bacillus subtilis* (438) diferiram do coinoculado com *Bacillus* sp. (449). Zhang et al. (1996) observaram que algumas BPCPs podem diminuir a MSN, como ocorreu com a coinoculada com *Bacillus* sp. (449), evidenciando assim que algumas BPCPs podem proporcionar uma competição na colonização das raízes da planta hospedeira em busca dos sítios de infecção, restringindo o acesso para o rizóbio.

Para tamanho médio dos nódulos (Quadro 2), os resultados revelaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos coinoculados com *Bacillus* sp. - 449 (2,57) e *B. subtilis* - 441 (9,20).

Os teores de N nas plantas de feijão-caupi inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas com *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey (Quadro 2). Esses dados corroboram os resultados de Silva (2003).

Em relação ao N acumulado na MSPA (N ac) do feijão-caupi (Quadro 2), a coinoculação *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus brasilensis* (24) não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey no tocante ao tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp.; contudo, diferiu do tratamento coinoculado com *Bacillus pumilus* (444). Figueiredo et al. (2008b) também encontraram diferenças entre tratamentos coinoculados com *Paenibacillus polymyxa* + *Rhizobium tropici* (308,2 mg/vaso de N) e *Bacillus pumilus* + *Rhizobium tropici* (224,2 mg/vaso de N).

No que se refere à eficiência da fixação do N<sub>2</sub> (EFN<sub>2</sub>) (Quadro 2), a coinoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus* sp. (449) superou em mais de 100 % o tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), sugerindo uma influência deste bacilo na fixação de N<sub>2</sub>. A coinoculação *Bradyrhizobium* sp. + *Bacillus* sp. (449) apresentou menores médias de biomassa e tamanho do nódulo, porém foi o tratamento com melhor eficiência na fixação de N<sub>2</sub> (818,24) (Quadro 2), indicando assim a importância da eficiência relativa, descrita por Xavier (2007).

Para nodulação específica (NE) (Quadro 2), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Esses resultados discordam dos encontrados por Figueiredo et al. (2008b), que observaram diferenças entre os tratamentos testemunhas (sem inoculação de BPCPs) e os coinoculados com *Paenibacillus polymyxa* ou *Bacillus pumilus*.

Segundo Cattelan (1999), há sinergismo entre bactérias promotoras de crescimento em plantas e bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> em leguminosas, o que confirma os resultados apresentados neste trabalho, observando-se efeito da coinoculação *Bradyrhizobium* sp.-BPCPs quanto a MSPA, MSN, Nac, EFN<sub>2</sub> e tamanho de nódulo em relação ao controle.

## CONCLUSÕES

1. As estirpes de *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e *Bacillus*, nas condições testadas, não apresentaram capacidade para produzir AIA nem solubilizar fosfato.
2. De acordo com as variáveis MSPA e EFN<sub>2</sub>, houve sinergismo das estirpes de *Bacillus* sp. (449) e *Bacillus pumilus* (444) coinoculadas com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) no feijão-caupi.
3. MSN, N ac e tamanho de nódulo evidenciaram diferenças entre as BPCPs coinoculadas.

## LITERATURA CITADA

- ARAÚJO, A.S.F.; CARNEIRO, R.F.V.; BEZERRA, A.A.C. & ARAÚJO, F.F. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: Efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 27 set. 2010.
- ARAÚJO, F.F. Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. Parte II – Microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura. Guaíba, Agrolivros, 2008. p.197-210.
- BAI, Y.; ZHOU, X. & SMITH, D. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Sci., 43:1174-1178, 2003.
- BOLTON, H.; ELLIOTT, L.F.; TURCO, R.F. & KENNEDY, A.C. Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth. Plant Soil, 123:121-124, 1990.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis chemical and microbiological properties. Madison, American Society of Agronomy, 1965. Part 2. p.1149-1178.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J. & OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem., 29:923-929, 1997.
- BURNS, T.A.; BISHOP, P.E. & ISRAEL, D.W. Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. Appl. Environ. Microbiol., 62:865-871, 1981.
- CAMACHO, M.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ- NAVARRO, D.N. & DAZA, A. Coinoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. Can. J. Microbiol., 47:1058-1062, 2001.
- CATTELAN, A.J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina, Embrapa Soja, 1999. 36p.
- CARDOSO, E.J.B.N. Curso de especialização em manejo do solo. 3º Módulo: Biologia e poluição do solo/recuperação de solos degradados e/ou contaminados. Piracicaba, 1999. 51p.
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L. & KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S. & GUPTA, V.K. Management of soil born diseases. Ludhiana, Kalyani, 1996. p.165-184.
- CORREA, J.D.; BARRIOS, M.L. & GALDONA, R.P. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. Plant Soil, 266:75-84, 2004.
- DAKORA, F.D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. New Phytol., 158:39-49, 2003.

- DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R. & SMITH, D.L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant Soil*, 200:205-213, 1998.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R. & CHANWAY, C.P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. by co-inoculation *Paenibacillus x Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.*, 40:182-188, 2008a.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A. & CHANWAY, C.P. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:1187-1193, 2008b.
- GOEL, A.K.; SINDHU, S.S. & DADARWAL, K.R. Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens. *Biol. Fert. Soils*, 36:391-396, 2002.
- GOMES, A.M.A.; MARIANO R.L.R.; SILVEIRA, E.B. & MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Hortic. Bras.*, 21:699-703, 2003.
- GORDON, S.A. & WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 26:192-195, 1951.
- HALVERSON, L.J. & HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2767-2770, 1991.
- HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y. & SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Syst Appl. Microbiol.*, 28:66-76, 2005.
- HAMEEDA, B.; RUPELA, O.P.; REDDY, G. & SATYAVANI, K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biol. Fert. Soils*, 43:221-227, 2006.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 1950. 32p.
- LACAVAL, P.T.; ANDREOTE, F.D. & AZEVEDO, J.L. Metabólicos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. Parte II – Microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura. Guaíba, Agrolivros. 2008. p 211-232.
- LI, D. & ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant Soil*, 108:211-219, 1988.
- LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C. & BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 81:373383, 2002.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P. & DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, Recife, 2004. Anais... Recife, 2004. p.89-111.
- MENDONÇA, A.L.L. *Bacillus* spp. produtores de proteases: Isolamento, caracterização e melhoramento de *B. cereus* (C124) Frankland & Frankland. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1995. 95p. (Tese de Mestrado)
- MIN-RYU, C.; HUI-HU, C.; LOCY, R.D. & KLOEPFER, J.W. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant soil*, 268:285-292, 2005.
- MOREIRA F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- PEREIRA, J.; MIRIAN, L.; AURELIANO, E.; RODRIGUES, J.; LEITE, J.; CARVALHO, F.; SANTOS, M. & DA PAZ, C. Interação de *Rhizobium* com bacterias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) na cultura de feijao caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 11., Fortaleza, 2008. Anais... Fortaleza, 2008. CD ROM.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L. & ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.*, 26:189-199, 2003.
- RAVERKER, K.P. & KONDE, B.K. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Plant Soil*, 106:249-252, 1988.
- RENWICK A.R.; CAMPBELL, R. & COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Physiol.*, 40:524-532, 1991.
- RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, 17:319-339, 1999.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T. & BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287:15-21, 2006.
- RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; LOGAN, N.A. & RODELAS, B. *Paenibacillus cineris*, *P. cookii* y *P. wynnii*, três nuevas especies fijadoras de nitrógeno atmosférico originarias de la Antártida. Nuevos confines de la fijación biológica de nitrógeno. In: REUNIÓN NACIONAL DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO, 10., Granada, 2004. Anais... Granada, 2004. p.15-18.
- SELDIN, L. *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Parte II – Microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura. Guaíba, Agrolivros, 2008. p.259-276.

- SILVA, L.E.S.F. Fixação do N<sub>2</sub> no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum*. sob condições de estresse hídrico. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003. 100p. (Tese de Mestrado)
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; MARTÍNEZ, C.R.; SELDIN, L.; BURITY, H.A. & FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. Acta Sci. Agron., 29:331-338, 2007.
- SILVA, F.A.S. Assistat - Assistência Estatística. Disponível em: <<http://www.assistat.com/index.html#down>> Acesso em: 29 jun. 2008.
- SILVEIRA, J.A.G.; CONTADO, J.L.; MAZZA, J.L.M. & OLIVEIRA, J.T.A. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. R. Bras. Fisiol. Veget., 10:9-23, 1998.
- SINDHU, S.S., GUPTA, S.K. & DADARWAL, K.R. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of plant growth in green gram (*Vigna radiata*). Biol. Fert. Soils, 29:62-68, 1999.
- SINDHU, S.S.; GUPTA, S.K.; SUNEJA, S. & DADARWAL, K.R. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. Biol. Plant., 45:117-120, 2002.
- SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. & MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdoes (MG), 1 – caupi. R. Bras. Ci. Solo., 30:795-802, 2006.
- SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófito-planta. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003. 137p. (Tese de Doutorado)
- SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D.J. & HOLL, F.B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbiol., 42:1006-1014, 1997.
- STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; FERRAZ, D.S.; MONTENEGRO, A. & SANTOS, C.E.R.S. Nitrogenfixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. Trop. Grasslands, 37:1-9, 2003.
- THILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N. & MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). Europ. J. Soil Sci., 57:67-71, 2006.
- TURNER, J. T. & BACKMAN, P.A. Factores relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. Plant Dis., 75:347-353, 1991.
- VESSEY, K. & BUSS, T.J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes – Controlled-environment studies. Can. J. Plant Sci., 82:282-290, 2002.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule-bacteria. Oxford, Blackwells Scientific Publications, 1970. 164p.
- XAVIER, T.F.; ARAUJO, A.S.F.; SANTOS, V.B. & CAMPO, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. Ci. Rural, 37:561-564, 2007.
- ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R.K. & SMITH, D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. Ann. Bot. Comp., 77:453-460, 1996.