



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FITOTECNIA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE**  
**BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM**  
**CAFÉ (*Coffea arabica* L.) NO SUDOESTE DA BAHIA**

**MÁIDA CYNTHIA DUCA DE LIMA**

**VITÓRIA DA CONQUISTA**  
**BAHIA – BRASIL**  
**2022**

**MÁIDA CYNTHIA DUCA DE LIMA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM  
CAFÉ (*Coffea arabica* L.) NO SUDOESTE DA BAHIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira

VITÓRIA DA CONQUISTA  
BAHIA – BRASIL  
2022

L732i Lima, Máida Cynthia Duca de.

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal em café (*Coffea arabica* L.) no sudoeste da Bahia. / Máida Cynthia Duca de Lima, 2022.

72f.

Orientador (a): Dr. Joilson Silva Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia, Vitória da Conquista, 2022.

Inclui referência F. 70 – 71.

1. *Coffea arabica* L. 2. Promoção de crescimento. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio. 4. Fitormônios. 5. Rizobactérias. I. Ferreira, Joilson Silva. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Área de concentração Fitotecnia. III.T.

CDD 633.73

**Catlogação na fonte: Juliana Teixeira de Assunção – CRB 5/1890**

UESB – Campus Vitória da Conquista – BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista, BA

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

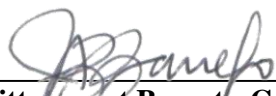
**TÍTULO: “ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CAFÉ (*Coffea arabica* L.) NO SUDOESTE DA BAHIA”**

**AUTOR: Máida Cynthia Duca de Lima.**

**Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela seguinte Banca Examinadora:**



\_\_\_\_\_  
**Joilson Silva Ferreira, D.Sc., Presidente (UESB)**



\_\_\_\_\_  
**Patricia Anjos Bittencourt Barreto-Garcia, D.Sc.,(UESB)**



\_\_\_\_\_  
**Dr. Erineudo de Lima Canuto, D.Sc.,(IFMT)**



\_\_\_\_\_  
**Daniele Cristina Costa Sabino , D.Sc.,(UFMT)**



\_\_\_\_\_  
**Gabriela Cavalcanti Alves, D.Sc., (CETEM/MCTI)**

Data de realização: 29 de Agosto de 2022

Estrada do Bem Querer, Km 4, CEP 45031-900, Caixa Postal 95, Vitória da Conquista,

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder vida e saúde, principalmente após longos anos de medos e incertezas, decorrentes da COVID-19 que ceifou a vida de mais de 600 mil brasileiros; e eu sou agraciada por essa dádiva que é viver em toda sua plenitude, permitindo a concretização dessa etapa tão importante em minha vida. GRATIDÃO!

Aos meus pais, fontes inesgotáveis de fé, que estiveram 100% presentes, mesmo morando há mais de 200 km de distância, e que sempre acreditaram em mim, até mesmo quando eu duvidava. A eles devo toda a minha vida. Amo muito vocês! Obrigada por tanto!

À minha irmã, que tenho como inspiração de vida, aquela que desde o meu nascimento nunca mediu esforços para me proteger, cuidar e me defender, que sempre faz de tudo para me ajudar e que me deu o meu maior presente, nossa Catarina. Amo tanto vocês, esse título é nosso!

A toda minha família (avó, tios, tias, primos, primas e minha afilhada amada, Rafaela), pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim; pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. Obrigada!

Ao meu namorado, Paulo Eduardo, que é a minha calma, meu porto seguro, personificação de paz, aconchego e amor. Você foi fundamental nesse processo.

Ao meu orientador, Dr. Joilson Ferreira, pelos ensinamentos e contribuições para o meu crescimento científico e intelectual.

À Rayka Kristian, pela paciência e por sempre estar disposta a me ajudar.

Ao meu amigo, meu irmão, Elismar Oliveira, muito obrigada pelas conversas, pela companhia e pela ajuda em todos os momentos. Aprecio sua amizade sincera e espero contar com ela sempre.

Aos amigos especiais do Grupo “Topa quase tudo”: Elismar, Paulo Monroe, Sarah, Rayka, Tâmara e Danilo, os quais eu considero como minha segunda família, que tornaram minha estadia mais leve e compartilharam diversos momentos comigo, sendo muitos deles uma forma de escape em meio ao caos. Gratidão amigos, vocês foram fundamentais nessa etapa.

Às minhas amigas de longa data, Tay, Taty e Kiki, por sempre estarem comigo, independentemente de tempo e distância, cujos encontros são sempre regados de muita alegria, os quais me recarregam e me reiniciam. Eu amo vocês!

A todos os amigos que fiz durante esse período e que foram essenciais para a realização deste trabalho, em especial, à Alexia e aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia Florestal, Rayka, Carol, Danilo, Joseani e Roger.

Ao pessoal do campo Agropecuário da UESB, pelo apoio e serviços prestados, principalmente o Dui, pela disponibilidade e agilidade na obtenção de área e insumos para a realização dos meus experimentos; e ao seu João, por cuidar tão bem das minhas “filhas”.

Ao professor Divino Miguel, pela concessão do Laboratório de Microbiologia do Solo, contribuindo para a realização de parte deste trabalho.

A todos os companheiros de longos ou curtos períodos no Laboratório de Microbiologia do Solo: Wallace, Caian e Iana, principalmente à Bruna e Mariana, por toda a paciência em passar seus ensinamentos sobre as bactérias diazotróficas. Aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar, quando sabemos dividir.

Ao clube das Luluzinhas, denominado “quarteto fantástico”: Ariane, Flavia e Walleka, por compartilhar todos os meus sonhos, anseios, medos e incertezas e me darem forças para seguir em frente, mesmo após eu não me sentir capaz.

À CAPES e À FAPESB, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada aos membros do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelo suporte, em especial, à coordenadora do programa, professora Dra Maria Aparecida Castellani.

A essa menina, que aqui vos escreve, nordestina, sertaneja e sonhadora, que estudou a vida toda em escola da rede pública e por estar concluindo um doutorado em uma universidade pública de qualidade e, por isso, agradece às políticas que puderam manter essas universidades de pé até o presente momento, para a concretização desse sonho. Toda a minha gratidão!

E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma (consciente ou não) para a materialização deste estudo, deixo aqui o meu muito obrigada!

## RESUMO GERAL

LIMA, M. C. D. **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CAFÉ (*Coffea arabica* L.) NO SUDOESTE DA BAHIA.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2022. 88 p. (Tese – Doutorado em Agronomia; Área de concentração: Fitotecnia)\*.

A cafeicultura é uma das atividades econômicas mais importantes no País e a utilização de mudas de alta qualidade é fundamental para o estabelecimento de cultivos bem sucedidos. Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal surge como uma alternativa viável para melhorar a performance produtiva das plantas e mitigar a dependência dos insumos agrícolas, contribuindo, assim, para a diminuição no custo de implantação da lavoura. Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar morfológica e fisiologicamente bactérias promotoras do crescimento vegetal do Planalto da Conquista – BA e estudar a associação dessas bactérias em duas variedades de café, em casa de vegetação e em campo, identificando os possíveis benefícios ao crescimento inicial das plantas. Foram conduzidos três experimentos para cada variedade de café, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista. Inicialmente, realizou-se o isolamento das bactérias em plantas de duas variedades de café e obteve-se 12 isolados para a variedade Catuaí vermelho IAC144 e 8 para a variedade Catucaí amarelo 2SL. Nessa primeira etapa, também foi realizada a caracterização morfológica e fisiológica dos isolados quanto à produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato e à fixação biológica de nitrogênio. Após a obtenção dos isolados, foram realizados dois experimentos de seleção das bactérias, um para cada variedade, buscando avaliar os isolados que auxiliaram no crescimento das plantas. Por fim, realizou-se um último experimento com níveis de nitrogênio associados aos isolados que apresentaram as melhores respostas para o crescimento das plantas na etapa de seleção, buscando identificar as bactérias que foram mais eficientes em absorver e disponibilizar o nitrogênio para as plantas. Observou-se que a inoculação com as bactérias promotoras de crescimento favoreceram respostas positivas para o crescimento inicial das plantas de café nas duas variedades e que a aplicação dessas bactérias tem potencial para ser usada como biofertilizante para o cultivo de café nas condições estudadas, em função da promoção de crescimento, caracterizadas como bactérias produtoras de auxina e responsivas à fixação biológica de nitrogênio *in vitro*.

**Palavras-chave:** Promoção de crescimento. Fixação Biológica de Nitrogênio. Fitormônios. Rizobactérias.

---

\* **Orientador:** Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira, UESB

## GENERAL ABSTRACT

LIMA, M. C. D. **ISOLATION, CHARACTERIZATION AND SELECTION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN COFFEE (*Coffea arabica* L.) IN SOUTHWEST BAHIA.** Vitória da Conquista – BA: UESB, 2022. 88 p. (Thesis: Master Science in Agronomy; Area of Concentration: Crop Science).\*

Coffee growing is one of the most important economic activities in the country and the use of high quality seedlings is essential for the establishment of successful crops. In this context, the use of plant growth-promoting bacteria emerges as a viable alternative to improve the productive performance of plants and mitigate dependence on agricultural inputs, thus reducing the cost of implementing the crop. Based on the above, this work aimed to isolate, morphologically and physiologically characterize bacteria that promote plant growth from Planalto da Conquista - BA and study the association of these bacteria in two coffee varieties, in a greenhouse and in the field, identifying the possible benefits to initial plant growth. Three experiments were carried out for each coffee variety, in the experimental area of the State University of Southwest Bahia, *campus* of Vitória da Conquista. Initially, the bacteria were isolated from plants of two coffee varieties and 12 isolates were obtained for the variety Catuaí vermelho IAC144 and 8 for the variety Catuaí amarelo 2SL. In this first step, the morphological and physiological characterization of the isolates regarding the production of indole compounds, phosphate solubilization and biological nitrogen fixation was also carried out. After obtaining the isolates, two bacterial selection experiments were carried out, one for each variety, seeking to evaluate the isolates that helped in the growth of the plants. Finally, a last experiment was carried out with nitrogen levels associated with the isolates that showed the best responses in plant growth in the selection stage, seeking to identify the bacteria that were more efficient in absorbing and making nitrogen available to the plants. It was observed that inoculation with growth-promoting bacteria favored positive responses in the initial growth of coffee plants in both varieties and that the application of these bacteria may have the potential to be used as a biofertilizer for coffee cultivation under the conditions studied, depending on of growth promotion, characterized as auxin-producing bacteria and responsive to biological nitrogen fixation in vitro.

**Keywords:** Promotion of growth. Biological Nitrogen Fixation. Phytohormones. Rhizobacteria.

---

\* **Adviser:** Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira, UESB



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Tratamentos das variedades de <i>Coffea arabica</i> , Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL com suas respectivas testemunhas.....	12
<b>Tabela 1.2</b> - <b>População</b> de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de folhas, raízes e solo rizosférico de duas variedades de café de plantios comerciais localizados em Barra do Choça – Ba no ano de 2020.....	14
<b>Tabela 1.3</b> - Isolados obtidos em seus respectivos meios de cultura, microambiente e diluição.....	15
<b>Tabela 1.4</b> - Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio por 20 isolados bacterianos de duas variedades de café, Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL.....	19
<b>Tabela 1.5</b> - Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos de café, quanto à produção de compostos indólicos .....	21
<b>Tabela 1.6</b> - Avaliação de crescimento de mudas de café variedade Catuaí vermelho IAC 144 inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, avaliadas aos 75 dias após o plantio em vasos ao ar livre.....	23
<b>Tabela 1.7</b> - Avaliação de crescimento de mudas de café variedade Catucaí amarelo 2SL inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, avaliadas aos 75 dias após o plantio em vasos ao ar livre.....	25
<b>Tabela 2.1</b> – Diâmetro (DIA), Altura (ALT), comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), proporção parte aérea e raiz (PA/R), índice SPAD (SPAD) e número de folhas (NUF) da variedade Catuaí IAC 144 de <i>Coffea arabica</i> , sob inoculação de isolados bacterianos.....	36
<b>Tabela 2.2</b> - Diâmetro (DIA), Altura (ALT), comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), proporção parte aérea e raiz (PA/R), índice SPAD (SPAD) e número de folhas (NUF) da variedade Catucaí 2SL de <i>Coffea arabica</i> , sob inoculação de isolados bacterianos.....	40
<b>Tabela 3.1</b> - Resumo da análise de variância, em relação às avaliações comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada.....	52
<b>Tabela 3.2</b> - Comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos.....	53

**Tabela 3.3** - Resumo da análise de variância, em relação às avaliações comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de *Coffea arabica* variedade Catucaí 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada..... 62

**Tabela 3.4** - Comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de *Coffea arabica* variedade Catucaí 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos..... 63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas pelo método de separação euclidiana de isolados bacterianos de *coffea arabica* da variedade Catuaí vermelho IAC 144. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum spp.* e *Burkholderia spp.*..... 17
- Figura 1.2** - Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas pelo método de separação euclidiana de isolados bacterianos de *coffea arabica* da variedade Catuaí amarelo 2SL. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum spp.* e *Burkholderia spp.*..... 18
- Figura 3.1** – Comprimento de raiz de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 55
- Figura 3.2** – Índice SPAD de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação do isolado bacteriano MCVC15, associado a diferentes níveis de Nitrogênio..... 55
- Figura 3.3** – Área foliar de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07, MCVC17 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 56
- Figura 3.4** – Diâmetro de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação do isolado bacteriano MCVC07 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 57
- Figura 3.5** – Altura de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07, MCVC17 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 58
- Figura 3.6** – Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e massa seca de raiz (MSRAIZ) (B) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 59
- Figura 3.7** – Transpiração (E) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolado bacteriano MCVC15 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 60
- Figura 3.8** – Fotossíntese (A) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio..... 61
- Figura 3.9** – Análise de componentes principais da distribuição das bactérias promotoras de crescimento de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC 144, associadas a doses de N (D0, D1, D2 e D3), em função das variáveis mensuradas: altura, diâmetro, comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR) e massa

seca de parte aérea (MSPA), área foliar (AF), Nitrogênio percentual (N%), fotossíntese (A) e transpiração (E).....	62
<b>Figura 3.10</b> - Altura de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16 e MCVC06, associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	64
<b>Figura 3.11</b> - Índice SPAD de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC04, MCVC06 e à testemunha (T2), associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	65
<b>Figura 3.12</b> - Área foliar de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16, MCVC06 e à testemunha (T2), associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	66
<b>Figura 3.13</b> - Massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC06, MCVC04 e MCVC16, associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	66
<b>Figura 3.14</b> - Massa seca de raiz (MSRAIZ) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC06, T2 e MCVC16, associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	67
<b>Figura 3.15</b> - Transpiração (E) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, submetido ao tratamento T2, associado a diferentes níveis de Nitrogênio.....	68
<b>Figura 3.16</b> – Fotossíntese (A) de plantas de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16 e MCVC06, associados a diferentes níveis de Nitrogênio.....	68
<b>Figura 3.17</b> - Análise de componentes principais da distribuição das bactérias promotoras de crescimento de <i>Coffea arabica</i> variedade Catucaí 2SL, associadas a doses de N (D0, D1, D2 e D3), em função das variáveis mensuradas: altura, diâmetro, comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), área foliar (AF), Nitrogênio percentual (N%), fotossíntese (A) e transpiração (E).....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcento
$\phi$	Diâmetro
°C	Graus Celsius
A	Fotossíntese
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AF	Área Foliar
AIA	Ácido Indol-3-Acético
$Al^{3+}$	Alumínio
ALT	Altura de plantas
ATP	Adenosina Trifosfato
BA	Bahia
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento vegetal
$Ca_3(PO_4)_2$	Fosfato de cálcio
cm	Centímetros
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CPR	Comprimento de Raiz
CV	Coefficiente de variação
DIA	Diâmetro
$dm^3$	Decímetro cúbico
E	Transpiração
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
$FeCl_3$	Cloreto férrico
FV	Fonte de Variação
G	Gramas
GL	Graus de Liberdade
$H^+$	Hidrogênio
$H_2O$	Água
IRGA	Analisador de gases infravermelho
IS	Índice de Solubilização
$K^+$	Potássio
Kc	Coefficiente da cultura
KCl	Cloreto de potássio
$Kg\ ha^{-1}$	Quilogramas por hectare
M	Metro
MFPA	Massa Fresca de Parte Aérea
MFR	Massa Fresca de Raiz
$Mg^{2+}$	Magnésio
mL	Mililitro

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromol
Mm	Milímetros
$\text{Mn}^{2+}$	Manganês
MSPA	Massa Seca da Parte Aérea
MSR e MSRAIZ	Massa Seca de Raiz
N	Nitrogênio
N %	Nitrogênio percentual
$\text{N}_2$	Nitrogênio atmosférico
$\text{NH}_3$	Amônia
nM	Namômetro
NMP	Número mais provável
NPK	Nitrogênio, Fósforo, Potássio
NUF	Número de Folhas
OIC	Organização Internacional do Café
P	Fósforo
$\text{P}_2\text{O}_5$	Superfosfato simples
PA/R	Relação Parte Aérea/Raiz
pH	Potencial hidrogeniônico
SB	Soma de Bases
SPAD	Intensidade de cor verde das folhas
T	Capacidade de troca catiônica
t	Capacidade de troca de cátions efetiva
T1 e T2	Testemunha 1 e 2
u.f.c	Unidade formadora de colônias
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
V	Saturação de base

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
3. ARTIGO I – Bioprospecção e seleção de bactérias promotoras de crescimento em duas variedades de café.....	5
RESUMO .....	6
ABSTRACT.....	6
3.1 INTRODUÇÃO.....	7
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.2.1 Isolamento das BPCV .....	8
3.2.2 Caracterização morfológica .....	9
3.2.3 Caracterização fisiológica.....	10
3.2.3.1 Avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio .....	10
3.2.3.2 Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio.....	10
3.2.3.3 Análise de produção de ácido indolacético (AIA) .....	11
3.2.4 Eficiência das bactérias em promover o crescimento de mudas de café .....	111
3.2.5 Análises estatísticas .....	133
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	144
3.3.1 Isolamento e Contagem de Número Mais Provável (NMP) dos isolados .....	144
3.3.2 Caracterização morfológica .....	166
3.3.3 Caracterização Fisiológica.....	1919
3.3.3.1 Potencial de fixação de Nitrogênio in vitro .....	19
3.3.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico .....	19
3.3.3.3 Produção de ácido indolacético (AIA).....	21
3.3.4 Eficiência das bactérias em promover o crescimento de mudas de café .....	233
3.4 CONCLUSÕES .....	266
REFERÊNCIAS.....	27
ARTIGO II - Bactérias de variedades de <i>Coffea arabica</i> L. com potencial para promoção de crescimento vegetal .....	31
RESUMO .....	32
ABSTRACT.....	32
4.1 INTRODUÇÃO .....	33
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	344
4.2.1 Seleção das bactérias.....	344
4.2.2 Análise estatística .....	366
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	366

4.4 CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS .....	42
ARTIGO III - Crescimento inicial de plantas de variedades de café associado à bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada .....	46
RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	47
5.1 INTRODUÇÃO .....	48
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
5.3.1 Variedade Catuaí vermelho IAC 144 .....	52
5.3.2 Variedade Catucaí amarelo 2SL .....	62
5.4 CONCLUSÕES .....	69
REFERÊNCIAS .....	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72



## INTRODUÇÃO GERAL

Para atender às demandas por alimentos de uma população humana de quase 10 bilhões de pessoas, projetada para habitar na Terra até 2050, a produtividade agrícola, de forma sustentável, deve aumentar em até 70% (FAO, 2021). Esse desafio oneroso deve ser enfrentado focado no desenvolvimento sustentável e ecológico das culturas, visando principalmente à redução do uso de produtos químicos, pois, caso contrário, pode acarretar em problemas à saúde humana e um desequilíbrio nos agroecossistemas (Cordell et al., 2011).

No Brasil, um importante fator de aumento da produtividade é o uso de fertilizantes químicos, porém, a capacidade interna de produção é insuficiente para suprir a necessidade requerida, fazendo com que o país seja o quarto maior importador do insumo. Para suprir essa demanda, o país importa 73% do seu fertilizante nitrogenado, 34% do fosfatado e 92% do potássico (DEPEC – Bradesco, 2017). Essa dependência pelo mercado externo tem sido motivo de preocupação, já que possui efeito direto sobre o custo de produção da lavoura e, tanto o uso indiscriminado quanto o método de produção desses fertilizantes, ocasionam sérios problemas de ordem ambiental, como a eutrofização do solo e águas subterrâneas, emissão de gases de efeito estufa, além de danos aos microrganismos do solo (Rosolem et al., 2003; Martinelli, 2007; Marks et al., 2013).

Dentre as atividades agrícolas de grande importância comercial no Brasil, destaca-se a cafeicultura, que foi responsável por movimentar cerca de 8,1 bilhões de dólares na safra 2021/2022 e 5,6 bilhões de dólares somente em exportações (ABIC, 2021). O Brasil encontra-se na posição de maior produtor, maior exportador e segundo maior consumidor mundial de café, produzindo cerca de 53 milhões de sacas na safra 2021/2022. Durante esse período, o Brasil exportou 39,6 milhões de sacas e consumiu 21,61 milhões de sacas, de acordo com os dados da Organização Internacional do Café (OIC, 2022).

Na região Sudoeste da Bahia, essa cultura assume papel de destaque também, traduzido pelos benefícios sociais e econômicos, por meio da capacidade geradora de empregos, e por apresentar boa produtividade. Além de se destacar como uma região produtora, é considerada também um centro de negócios de café, onde se encontram as empresas compradoras e exportadoras de café da Bahia. Estas características tornam a exploração da cultura do café um negócio atrativo e competitivo para a região.

Os cafezais, em sua grande maioria, estão implantados em solos de baixa fertilidade natural, visando maximizar a produtividade dos sistemas adotados com cafeeiros. Um dos nutrientes requeridos em grandes quantidades e que limita o crescimento das plantas é o nitrogênio, devido as suas funções metabólicas essenciais às plantas, como componente estrutural de macromoléculas, enzimas, síntese de clorofilas, aminoácidos, proteínas, vitaminas, citocromos, ácidos nucléicos e hormônios (Marschner e Marschner, 2012; Andrews et al., 2013).

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) surge como uma alternativa viável para melhorar a performance produtiva das plantas e mitigar a dependência dos insumos agrícolas, contribuindo, assim, para a diminuição no custo de implementação da lavoura (Oliveira et al., 2015; Grady et al., 2016). Diversos estudos têm demonstrado que as bactérias promotoras de crescimento possuem uma íntima interação com as plantas e têm se mostrado bastante eficientes por suas funções de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, além de protegê-las contra fitopatógenos e pragas, promovendo maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico (Shiva et al., 2018; Cargnelutti et al., 2021).

Além disso, a utilização dessas bactérias em plantas de café pode significar aumento na germinação de sementes, rendimento de grãos, redução de doenças e melhoria do crescimento de plantas. Isso torna o produto diferenciado e, conseqüentemente, eleva sua competitividade no mercado com custos reduzidos para o produtor (Osório Filho et al., 2014; Szilagy-Zecchin et al., 2015).

A utilização das BPCV, associada à fixação biológica de nitrogênio, constitui uma importante vantagem, já que a interação eucarioto x procarioto pode suprir total ou parcialmente a necessidade de nitrogênio requerida pelas plantas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor (Moreira et al., 2010).

Apesar de ser uma atividade econômica importante, pouco se sabe sobre a composição da comunidade bacteriana associada ao solo dos cafezais e como essa comunidade se comporta. Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar morfológica e fisiologicamente bactérias diazotróficas, e avaliar a capacidade de promover o crescimento inicial de duas variedades de café tradicionalmente cultivadas no Planalto da Conquista - BA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (Rio de Janeiro, RJ). **Mercado do café no Brasil**. Disponível em: <http://abic.com.br/estatisticas/exportacoes/>. Acesso em: 20 jul. 2019.

Andrews, M.; Raven, J. A.; Lea, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, p. 1-26, 2013. <https://doi.org/10.1111/aab.12045>

Cargnelutti, D.; Bampi, E.; De Melo Santiago, G.; Da Luz, V. C.; Garbin, E.; Castamann, A.; Mossi, A. J. **Soluções tecnológicas emergentes para uma agricultura sustentável: microrganismos eficientes**. Agroecologia: princípios e fundamentos ecológicos aplicados na busca de uma produção sustentável, Canoas: Mérida Publishers, p. 31-62, 2021. [10.4322/mp.978-65-991393-9-0.c2](https://doi.org/10.4322/mp.978-65-991393-9-0.c2)

Cordell, D.; Rosemarin, A.; Schröder, J. J.; Smit, A. L. Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. **Chemosphere**, v. 84, n. 6, p. 747-758, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.032>

DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. Bradesco. Disponível em: <https://www.bradespar.com.br/SiteEconomiaEmDia/Publicacoes/Cenario-Economico>. Acesso em: janeiro de 2023.

FAO. 2021. **World Food and Agriculture** - Statistical Yearbook 2021.

Grady, E. N.; MacDonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z. C. **Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review**. Microb Cell Fact, v. 1, n. 203, p. 1-15, 2016. [10.1186/s12934-016-0603-7](https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7)

Marks, B. B.; Megías, M.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, p. 01-21, 2013. [10.1186/2191-0855-3-21](https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21)

Marschner, H.; Marschner, P. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3 ed. London: Academic Press.

Martinelli L. A. **Os caminhos do nitrogênio** - do fertilizante ao poluente. Informações agrônômicas, número 118, jun. 2007. <https://doi.org/10.5902/223611704671>

Moreira, F. M. S.; Da Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; De Carvalho, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99. 2010.

Oliveira, A. L. M.; Lima, K.; Barbosa, M.; Sanos, O. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56-77, 2014. [10.5433/2316-5200.2014v3n1p56](https://doi.org/10.5433/2316-5200.2014v3n1p56)

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. **Relatório sobre o mercado de café**: jan. 2022. [Londres].

Osorio Filho, B.D.; Gano, K. A.; Binz, A.; Lima, R. F.; Aguilar, L. M.; Ramirez, A.; Caballero-Mellado, J.; De Sá, E. L. S.; Giongo, A. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, v.14, n.8, p.707-718, 2014. [10.5829/idosi.aejaes.2014.14.08.12377](https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2014.14.08.12377)

Rosolem, C.A.; Foloni, J.S.S.; Oliveira, R.H. Dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem e adubação nitrogenada, com palha na superfície. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.301-309, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000200018>

Shiva, S.; Enniful, R.; Roth, M. R.; Tamura, P.; Jagadish, K.; Welti, R. An efficient modified method for plant leaf lipid extraction results in improved recovery of phosphatidic acid. *Plant Methods*, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0282-y>

Szilagyi-Zecchin, V. J.; Mógor, Á. F.; Ruaro, L.; Röder, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fzb42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 38, p. 26 – 33, 2015. <https://doi.org/10.19084/rca.16865>

**ARTIGO I**

Bioprospecção e seleção de bactérias promotoras de crescimento em duas variedades de café\*

---

\* **Situação:** Submetido

## **Bioprospecção e seleção de bactérias promotoras de crescimento em duas variedades de café**

**RESUMO** - Bactérias promotoras do crescimento vegetal são encontradas aderidas ao solo, nas folhas ou colonizando a superfície da raiz de muitas culturas, aumentando sua produtividade. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar morfológica e fisiologicamente bactérias promotoras de crescimento de duas variedades de café cultivados no Planalto da Conquista – BA. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por meio de dois isolamentos, um para a variedade Catuaí vermelho IAC 144 e o outro para a Catucaí amarelo 2SL. Foram coletadas folhas, raízes e solo rizosférico em plantas de duas variedades de café, Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL; e realizadas diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$  de cada um desses materiais, transferindo-se 1 ml da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio contendo solução salina e, para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas em frascos contendo meios semissólidos. Além disso, os isolados foram caracterizados morfológica e fisiologicamente. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições, cujos tratamentos foram 12 isolados da variedade Catuaí e uma testemunha, perfazendo 65 parcelas e oito isolados e uma testemunha para a variedade Catucaí, totalizando 45 parcelas. Aos 75 dias, avaliou-se a altura das plantas, diâmetro, massa fresca e massa seca de raiz e de folhas e número de folhas. Os isolados foram agrupados em um dendrograma de similaridade, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Ao final do experimento, foi obtido um total de 20 isolados bacterianos, 12 para a variedade Catuaí e oito para a Catucaí. Todos os isolados produziram compostos indólicos e promoveram a fixação biológica de nitrogênio *in vitro*. O dendrograma de similaridade agrupou um maior número de isolados, como semelhantes ao gênero *Burkholderia*, para as duas variedades. Todos os isolados promovem incrementos em mudas de café para as variáveis: diâmetro, altura, massa fresca e massa seca de parte aérea, tendo o isolado MCVC14, para a variedade Catuaí; e MCVC08, para a variedade Catucaí, se sobressaído com maiores valores para essas características.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*. Promoção de Crescimento. Bactérias diazotróficas.

**ABSTRACT** - Plant growth-promoting bacteria are found attached to the soil, on leaves or colonizing the root surface of many crops, increasing their productivity. The objective of this work was to isolate, morphologically and physiologically characterize growth-promoting bacteria from two coffee varieties grown in Planalto da Conquista - BA. The work was carried out at the State University of Southwest Bahia, through two isolations, one for the Catuaí Vermelho IAC 144 variety and the other for the Catucaí Amarelo 2SL. Leaves, roots and rhizospheric soil were collected from plants of two coffee varieties, Catuaí Vermelho IAC 144 and Catucaí Amarelo 2SL, and serial dilutions from  $10^{-2}$  to  $10^{-7}$  of each of these materials were carried out, transferring 1 ml of the suspension of each dilution into test tubes containing saline solution and for each of the dilutions, 0.1 ml aliquots were inoculated into flasks containing semi-solid media. Furthermore, the isolates were characterized morphologically and physiologically. The experimental design was in randomized blocks with five replications, whose treatments were 12 isolates of the Catuaí variety and a control, making up 65 plots and eight isolates and a control for the Catucaí variety, totaling 45 plots. At 75 days, plant height, diameter, fresh and dry mass of roots and leaves and number of leaves were evaluated. The isolates were grouped in a similarity dendrogram, the data were submitted to analysis of variance and

the averages compared by the Scott-Knott test, at 5% of significance. At the end of the experiment, a total of 20 bacterial isolates were obtained, 12 for the Catuaí variety and eight for Catucaí. All isolates produced indole compounds and promoted biological nitrogen fixation in vitro. The similarity dendrogram grouped a greater number of isolates as similar to the genus *Burkholderia* for both varieties. All isolates promote increments in coffee seedlings for the variables diameter, height, fresh mass and dry mass of shoots, whose isolate MCV14 for the Catuaí variety and MCV08 for the Catucaí variety stood out with higher values for these characteristics.

**Key word:** *Coffea arabica*. Growth Promotion. Diazotrophic bacteria.

## 1. Introdução

O café é uma das culturas mais importantes no cenário econômico nacional por movimentar cerca de 8,1 bilhões de dólares na safra 2021/2022, e 5,6 bilhões de dólares somente em exportações. O Brasil se encontra na posição de maior produtor, maior exportador e segundo maior consumidor mundial de café, produzindo cerca de 53 milhões de sacas na safra 2021/2022. Durante esse período, o Brasil exportou 39,6 milhões de sacas e consumiu 21,61 milhões de sacas de acordo com os dados da Organização Internacional do Café (OIC, 2022).

Para alcançar elevadas produtividades na agricultura, a utilização de mudas de alta qualidade na fase inicial, quando elas são submetidas às condições ambientais mais adversas, é fundamental para o estabelecimento de cultivos bem-sucedidos, especialmente tratando-se de culturas perenes, como é o caso do café (Matiello et al., 2008). Uma alternativa viável para a agricultura moderna que pode melhorar as condições iniciais de estabelecimento e crescimento de mudas por meio de um sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos para melhor captação de água, nutrientes e a realização da fotossíntese, consiste na utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). A presença desses microrganismos associativos benéficos pode agir como biofertilizantes (aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta), fitoestimulantes (devido à promoção de crescimento de plantas, geralmente através de hormônios), rizoremediadores (devido à degradação de poluentes orgânicos) e auxiliando no fornecimento de nitrogênio, que é um elemento de extrema importância para as plantas.

Estudos de inoculação de bactérias em mudas de café ainda são incipientes, mas alguns autores já confirmaram o potencial da utilização desses microrganismos para a promoção de crescimento. Silva et al. (2012) constataram o uso de bactérias endofíticas

no controle da ferrugem em folhas de café, Sakiyama (2001) e Sakiyama et al. (2003) confirmaram maior desenvolvimento de explantes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* em mudas inoculadas, Silva, Barbosa e Franco Junior (2020); Ricci et al. (2005) observaram que, com a inoculação de *Azospirillum brasilense* em plantas de café orgânico, houve maior crescimento da raiz principal e quantidade de massa fresca de raiz, e maior crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de café, respectivamente.

Tendo em vista os benefícios advindos do uso de BPCV, são necessárias pesquisas que busquem explorar mais a diversidade e funções desses microrganismos em plantas de café. Por este motivo, este estudo teve por objetivo isolar, caracterizar morfológica e fisiologicamente bactérias promotoras de crescimento de plantas de duas variedades de café.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Isolamento das BPCV**

O estudo foi desenvolvido em um plantio comercial com duas variedades de *Coffea arabica* L., Catuaí vermelho (IAC 144) e Catuaí amarelo (2SL), com 5 anos de idade e espaçamento de 3 m x 0,8 m, localizado em uma fazenda, situada no município de Barra do Choça, Bahia, Brasil.

A região encontra-se situada a 14°85'25" de latitude Sul e 40°52'04" de longitude Oeste e, apresenta clima tropical de altitude (Cwb), segundo a classificação climática de Köppen, precipitação média anual de 1080 mm, altitude de 900 m e temperaturas médias de 25,3 °C (máxima) e de 16,1 °C (mínima). O relevo é plano a suavemente ondulado. O solo corresponde a classe Latossolo Amarelo Distrófico (EMBRAPA, 2006).

Foram coletadas folhas, raízes e solo rizosférico em plantas das duas variedades Catuaí vermelho (IAC 144) e Catuaí amarelo (2SL), cujas coletas foram realizadas de forma aleatória nas linhas de plantio.

O material foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório para a realização do isolamento das bactérias. O material vegetal foi lavado superficialmente em água corrente e, em seguida, com água destilada, para eliminação dos resíduos do solo. As amostras foram fragmentadas pesando-se 10 g e trituradas em liquidificador com 90 ml de solução salina a fim de obter uma solução na concentração  $10^{-1}$ .



Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , transferindo-se 1 ml da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina. Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 ml, foram inoculadas em frascos de vidros de penicilina contendo 6 ml dos meios semissólidos sem a adição de nitrogênio em triplicata, nos meios JNFb para *Herbaspirillum spp.*, NFb para *Azospirillum spp.*, JMV para *Burkholderia spp.* e LGI para *Azospirillum amazonense*.

Todos os frascos contendo o meio de cultivo inoculado com as bactérias foram incubados a 30°C por cinco dias, avaliando-se posteriormente a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película aerotóxica típica, próxima da superfície do meio.

Confirmado o crescimento das bactérias, realizou-se a contagem da população de bactérias promotoras de crescimento de acordo com a técnica do número mais provável (NMP) descrita por Baldani et al. (2014). Posteriormente, realizou-se a repicagem do material para seus respectivos meios sólidos em placas de Petri, efetuando assim uma melhor observação do desenvolvimento das colônias sobre os meios de cultura específicos.

Em seguida, novas repicagens foram realizadas após um período de sete dias, a fim de se verificar a purificação das colônias reativadas, e as placas de Petri foram incubadas em estufa BOD a 30°C. Quando purificados, os isolados foram estocados em vidros de penicilina contendo meio de cultura batata, adicionado na superfície óleo mineral estéril. Os materiais reativados foram então utilizados para a produção do inoculante composto pelo meio de cultura Dygs líquido.

## **2.2 Caracterização morfológica**

Após a purificação dos isolados, realizou-se a caracterização morfológica, cujas colônias foram avaliadas após 7 dias de crescimento em meios sólidos específicos, JNFb para *Herbaspirillum spp.*, NFb para *Azospirillum spp.*, JMV para *Burkholderia spp.* e LGI para *Azospirillum amazonense* e a distinção das colônias foi realizada a olho nu e com auxílio de uma lupa, observando as seguintes características culturais: coloração das colônias (branca, rosa, rosa-claro, creme, creme-escuro, creme com centro escuro), consistência das colônias (mole, consistente, dura), forma e elevação de borda (circular, irregular, puntiforme elevada, convexa, plana) e margem (inteira, ondulada, irregular) de acordo com a metodologia de Nobrega et al. (2004).

A caracterização foi realizada com base em chave de identificação (Hungria e Silva, 2011).

## **2.3 Caracterização fisiológica**

### **2.3.1 Avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio**

Os isolados bacterianos foram avaliados conforme sua capacidade em fixar nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), de forma qualitativa *in vitro*, uma vez que, os frascos contendo os meios de cultura semissólidos e semisseletivos sem adição de nitrogênio, foram incubados a 30 °C, por cinco dias.

Após esse período, consideraram-se positivos para FBN, aqueles que desenvolveram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio, característica de microrganismos diazotróficos.

Os meios que formaram películas aerotóxicas foram repicados para novos meios semissólidos, até formação de nova película, objetivando purificar o material, como mecanismo para confirmar o crescimento e estabilidade da película.

### **2.3.2 Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio**

Para identificar a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato, as colônias foram cultivadas em meio Dygs líquido por 24 horas sob temperatura de  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  e em rotação de 180 rpm. Em seguida, usando o método do plaqueamento em gota, foram inoculadas três gotas com alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  na superfície do meio de cultivo solidificado em Placa de Petri. O meio empregado para determinar essa característica foi o NBRIP (National Botanical Research Institute) (Nautiyal, 1999), uma vez que, para a solubilização de fosfato inorgânico acrescentou-se no preparo do meio 5 g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> cujo meio foi preparado usando glicose como fonte de carbono, com pH 6,0 e avolumado para 1 L, conforme o procedimento de preparo.

Os isolados foram avaliados por um período de 15 dias, por meio da obtenção das médias das três repetições. As medidas do diâmetro ( $\phi$ ) dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e as do  $\phi$  das colônias foram mensuradas a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado por meio da fórmula:  $\text{IS} = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$  (Hara e Oliveira, 2005).

Com base nos índices de solubilização, as bactérias foram classificadas como isolados com baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS < 4$ ) e alta solubilização ( $IS > 4$ ). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia; tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e não-solubilizadoras aparentes, aquelas que não apresentaram solubilização visível até o 15º dia de avaliação (Hara e Oliveira, 2005).

### **2.3.3 Análise de produção de ácido indolacético (AIA)**

Para avaliação e quantificação da produção do ácido indolacético, os isolados bacterianos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 ml do meio líquido KingB modificado suplementado com 5  $\mu$ M de L-triptofano (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), incubados sob agitação de 180 rpm, a 28 °C com pH ajustado para 6,8, na ausência de luz, por um período de 72 horas em triplicata, de acordo com a metodologia de Glickmann e Dessaux (1995).

Após o crescimento da cultura bacteriana, alíquotas de 1 ml da suspensão bacteriana foram centrifugadas em um microtubo a 12.000 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou 1 ml do reagente de Salkowsky (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 35% de ácido perclórico) para que ocorresse a reação de pigmentação do meio de acordo com as concentrações do hormônio.

As amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e após este período, foi realizada a quantificação de AIA pela medição da absorbância utilizando-se espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF) em um comprimento de onda de 540 nm, sendo a concentração dos compostos indólicos estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado, e quantidades conhecidas de ácido indolacético de 0, 5, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, de acordo com a equação  $\hat{y} = 0,0123x + 0,0563$  ( $R^2 = 0,9951$ ).

### **2.4 Eficiência das bactérias em promover o crescimento de mudas de café**

Para avaliar a eficiência das bactérias em promover o crescimento de mudas de duas variedades de *Coffea arabica* L., Catuaí vermelho IAC 144 e Catuaí amarelo 2SL, foram conduzidos dois experimentos independentes em vasos em campo aberto, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Vitória da Conquista – Ba, com duração de 75 dias.

A eficiência das bactérias foi verificada por meio da inoculação dos isolados em mudas de café. Para isso, foram utilizados os 20 isolados bacterianos encontrados nas duas variedades de café, cultivados em meio Dygs líquido por 24 horas, a 30 °C, para o preparo do inoculante, onde foi adicionado 5 ml da solução bacteriana diretamente no sistema radicular das plantas, no momento do plantio das mudas. Foi montado dois experimentos, um para cada variedade, sendo avaliados separadamente.

As mudas foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de 18 litros, e o solo utilizado para o enchimento dos vasos, foi característico do *campus* da UESB - Vitória da Conquista, e classificado de acordo com a classe textural como franco argilo arenoso, com suas devidas correções de fertilidade de acordo com a análise de solo precedentes ao plantio. O solo da área de cultivo apresentava as seguintes características: pH: 5,0; P: 1,0 mg dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup>: 0,13 cmol c dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>: 1,0 cmol c dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>: 0,7 cmol c dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>: 0,3 cmol c dm<sup>-3</sup>, V% 45, m% 14, na camada de 0-20 cm de profundidade, tendo sido corrigido com a adição 2,7 g de calcário dolomítico em cada vaso.

Para a montagem do primeiro experimento com a variedade Catuaí vermelho IAC 144, adotou-se o delineamento em blocos casualizados, com 5 repetições, onde os tratamentos foram os 12 isolados da variedade Catuaí e mais uma testemunha sem inoculação (T1), perfazendo 65 parcelas (Tabela 1). Para a variedade Catucaí amarelo 2SL adotou-se o mesmo arranjo experimental, por meio da utilização dos 8 isolados da variedade Catucaí e 1 testemunha sem inoculação (T2) totalizando 45 parcelas (Tabela 1).

**Tabela 1-** Tratamentos das variedades de *Coffea arabica*, Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL com suas respectivas testemunhas.

Tratamento	Variedade
T1	Catuaí IAC 144
MCVC01	Catuaí IAC 144
MCVC 02	Catuaí IAC 144
MCVC 03	Catuaí IAC 144
MCVC 05	Catuaí IAC 144
MCVC 07	Catuaí IAC 144
MCVC 09	Catuaí IAC 144
MCVC 11	Catuaí IAC 144
MCVC 13	Catuaí IAC 144
MCVC 14	Catuaí IAC 144
MCVC 15	Catuaí IAC 144
MCVC 17	Catuaí IAC 144
MCVC 19	Catuaí IAC 144
Tratamento	Variedade

T2	Catucaí 2SL
MCVC 04	Catucaí 2SL
MCVC 06	Catucaí 2SL
MCVC 08	Catucaí 2SL
MCVC 10	Catucaí 2SL
MCVC 12	Catucaí 2SL
MCVC 16	Catucaí 2SL
MCVC 18	Catucaí 2SL
MCVC 20	Catucaí 2SL

---

As mudas utilizadas para a montagem do experimento para as duas variedades possuíam idades de 150 dias, provenientes de um viveiro comercial localizado na cidade de Barra do Choça (BA).

Após 75 dias de experimento ao ar livre, avaliou-se a altura (cm) das plantas com auxílio de régua graduada, o diâmetro (mm) com um paquímetro digital e contagem do número de folhas. Após isso, as plantas foram retiradas do campo e levadas ao laboratório para a obtenção da massa fresca de raiz e parte aérea, massa seca de parte aérea e raiz, onde o material foi acondicionado em embalagens de papel e submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, durante 72 horas, e o peso foi verificado utilizando balança de precisão de 0,001 g. As plantas foram comparadas ao controle (plantas não inoculadas) a fim de correlacionar a interação da bactéria na melhoria dos fatores de crescimento inicial da cultura.

## **2.5 Análises estatísticas**

A análise morfológica dos isolados foi realizada com base nas características relacionadas a morfologia das colônias e padrões conhecidos e descritos na literatura, para isso, construiu-se um dendrograma de similaridade com uso do software XLSTAT versão 22.3 (Addinsoft, 2020), com base na distância euclidiana, que pressupõe que quanto maior o valor observado menos parecidos serão os objetos, visando comparar e agrupar os isolados em classes.

Os dados referentes a mensuração das plantas em vasos, foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett), e após a verificação positiva em ambos, utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade para o agrupamento das médias no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Isolamento e Contagem de Número Mais Provável (NMP) dos isolados

O resultado do isolamento e da contagem, mostrou que houve variações na ocorrência de bactérias promotoras de crescimento nos diferentes microambiente e meios de cultura que foram realizados os isolamentos dos materiais vegetais para as duas variedades, havendo a formação de película aerotóxica característica, nos meios semissólidos JMV, NFb, JNFb e LGI (Tabela 2).

**Tabela 2-** População de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de folhas, raízes e solo rizosférico de duas variedades de café de plantios comerciais localizados em Barra do Choça – Ba no ano de 2020.

VAR	NMP											
	-----NFb-----			-----JNFb-----			-----JMV-----			-----LGI-----		
	F	R	S	F	R	S	F	R	S	F	R	S
Catuaí	7,5x10 <sup>2</sup>	7x10 <sup>5</sup>	7,5x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>1</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	9,5x10 <sup>6</sup>	0	4x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>6</sup>
Catuaí	2x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	6,5x10 <sup>2</sup>	4x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	4x10 <sup>1</sup>	4x10 <sup>1</sup>	4x10 <sup>2</sup>	7x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>1</sup>

\*NMP: número mais provável / VAR: Variedades/F: folha/ R: raiz/ S: solo rizosférico

Para a variedade Catuaí, é possível observar, que a população de bactérias foi superior no solo rizosférico, seguido pela raiz e folha, para todos os meios de cultura. Já para a variedade Catuaí, a maior população de bactérias foi verificada na raiz das plantas nos meios NFb e JNFb. No meio JMV observou-se uma maior população no solo rizosférico e somente no meio LGI que a população de bactérias foi superior na folha.

Os resultados para a população de bactérias, obtidos por microambientes, estão de acordo com os encontrados por Souza (2018), que no isolamento de bactérias em variedades de café, nos meios NFb, JNFb e JMV, obteve uma maior quantidade de isolados nas raízes, representando 90,4% do total das estirpes isoladas (66) e apenas 9,6% (7) foram correspondentes à parte aérea. A capacidade para liberar uma grande variedade de compostos para a rizosfera é uma das características metabólicas mais notáveis das raízes das plantas, com cerca de 5-21% de carbono total fotossinteticamente fixado sendo transferido para a rizosfera através da exsudação radicular (Nguyen, 2003; Galdiano Júnior et al., 2011).

Essa maior população de bactérias nas raízes pode estar associada ao fenômeno quimiotático, que atrai bactérias em direção aos exsudatos radiculares, justificando que o crescimento radicular implica em aumento de substratos de carbono na zona radicular, os

quais promovem a proliferação de rizobactérias em face deste ambiente (Hartmann et al., 2009). Essas moléculas podem atrair BPCV e inibir bactérias patogênicas, através de competição de nicho ou compostos antibacterianos (Bais et al., 2006).

Embora a filosfera seja um *habitat* microbiano com reduzida população de bactérias como relatado no presente estudo e na literatura (Lindow e Brandl, 2003; Vorholt, 2012) e as principais doenças do cafeeiro sejam por vias foliares, ainda não há dados com relação à microbiota de folhas de café. Sabe-se que a composição, a diversidade e a abundância de bactérias nas folhas depende de vários fatores, como o genótipo da planta hospedeira, a idade da folha, as condições ambientais (isto é, a umidade, radiação UV, temperatura) e disponibilidade de macro e micronutrientes (Lindow e Brandl, 2003).

É possível observar que, mesmo com altos valores da população inicial de bactérias (Tabela 2), esse número não refletiu no número total de isolados, que após a purificação por material de origem (raiz, folha e solo rizosférico), obteve-se um total de 20 isolados bacterianos, provenientes de plantas adultas de café, sendo 12 isolados da variedade Catuaí vermelho IAC 144 e 8 isolados da variedade Catuaí amarelo 2SL (Tabela 3).

**Tabela 3-** Isolados obtidos em seus respectivos meios de cultura, microambiente e diluição.

<b>Variedade Catuaí IAC 144</b>			
Isolado	Meio	Origem	Diluição
MCVC01	JMV	Folha	10 <sup>-1</sup>
MCVC 02	JMV	Solo	10 <sup>-1</sup>
MCVC 03	JMV	Raiz	10 <sup>-2</sup>
MCVC 05	JMV	Solo	10 <sup>-2</sup>
MCVC 07	JMV	Solo	10 <sup>-3</sup>
MCVC 09	JMV	Raiz	10 <sup>-4</sup>
MCVC 11	JMV	Solo	10 <sup>-5</sup>
MCVC 13	JMV	Solo	10 <sup>-7</sup>
MCVC 14	JNFb	Folha	10 <sup>-1</sup>
MCVC 15	JNFb	Solo	10 <sup>-1</sup>
MCVC 17	JNFb	Solo	10 <sup>-4</sup>
MCVC 19	NFb	Folha	10 <sup>-1</sup>
<b>Variedade Catuaí 2SL</b>			
Isolado	Meio	Origem	Diluição
MCVC 04	JMV	Raiz	10 <sup>-2</sup>
MCVC 06	JMV	Solo	10 <sup>-2</sup>
MCVC 08	JMV	Solo	10 <sup>-3</sup>
MCVC 10	JMV	Raiz	10 <sup>-4</sup>

MCVC 12	JMV	Raiz	10 <sup>-6</sup>
MCVC 16	JNFb	Raiz	10 <sup>-4</sup>
MCVC 18	JNFb	Folha	10 <sup>-1</sup>
MCVC 20	NFb	Solo	10 <sup>-2</sup>

Dos 12 isolados da variedade Catuaí, obteve-se 7 isolados no solo rizosférico (58,3%), 3 isolados de folha (25%) e 2 da raiz (16,7%). Deste total, 8 isolados foram provenientes do meio JMV (similares a *Burkholderia* spp.), 3 isolados encontrados no meio JNFb (similares a *Herbaspirillum* spp.) e 1 isolado de NFb (similares a *Azospirillum* spp).

Já em relação a variedade Catucaí, obteve-se 3 isolados no solo rizosférico (37,5%), 1 de folha (12,5%) e 4 da raiz (50%), totalizando 8 isolados. Deste total, obteve-se 5 isolados do meio JMV (similares *Burkholderia* spp.), 2 isolados de JNFb (similares *Herbaspirillum* spp.) e 1 isolado de NFb (*Azospirillum* spp).

Não foram obtidos isolados no meio LGI, apresentando a ausência de microrganismos bacterianos do gênero *Gluconacetobacter*, pois, após sucessivas repicagens, as colônias isoladas não mantiveram seu crescimento após a purificação dos isolados, para nenhuma variedade avaliada.

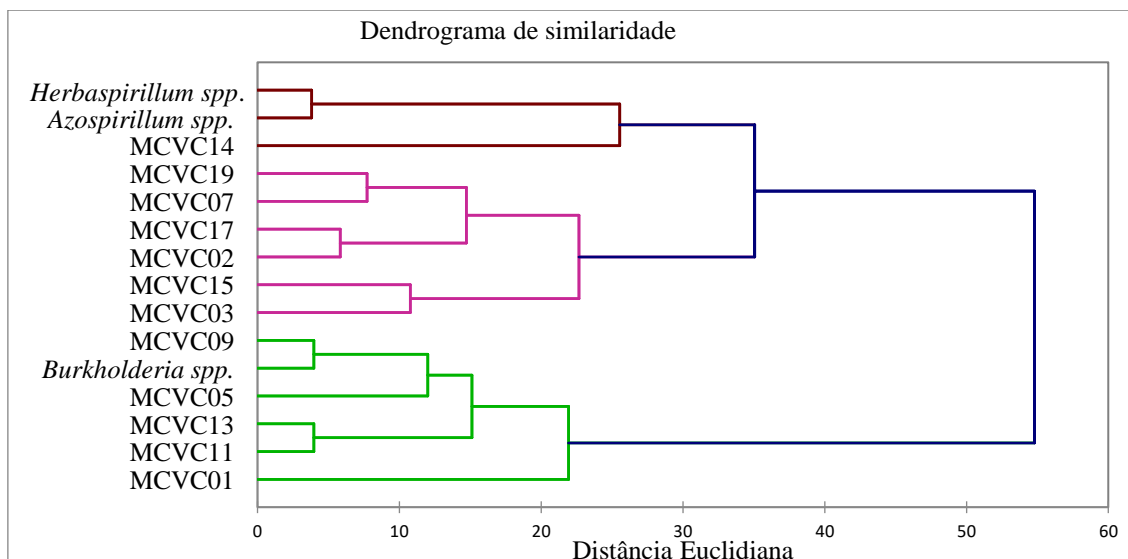
As variações que ocorrem na comunidade bacteriana cultivável associada às variedades de café pode estar relacionada à liberação de exsudatos, pois as modificações que ocorrem na população microbiana da raiz e do solo da rizosfera são altamente dependentes do tipo de solo, espécie vegetal e genótipo utilizado (Ribeiro, 2018; Castellanos, et al., 2010).

Estudos realizados por Caldwell et al. (2015) corroboram com o presente trabalho, no qual eles avaliaram a diversidade procariótica na rizosfera de fazendas de café orgânicas, intensivas e de transição no Brasil, e constataram que, assim como em outros microbiomas do solo, o solo rizosférico associado às plantas de café continha um grupo altamente diversificado de procariontes.

### 3.2 Caracterização morfológica

A diversidade fenotípica rizobacteriana encontrada através da caracterização morfológica dos isolados das duas variedades de café, Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL, pode ser observada nos dendrogramas de similaridade das Figuras 1 e 2, respectivamente. O dendrograma de similaridade agrupou os isolados em três grandes grupos.



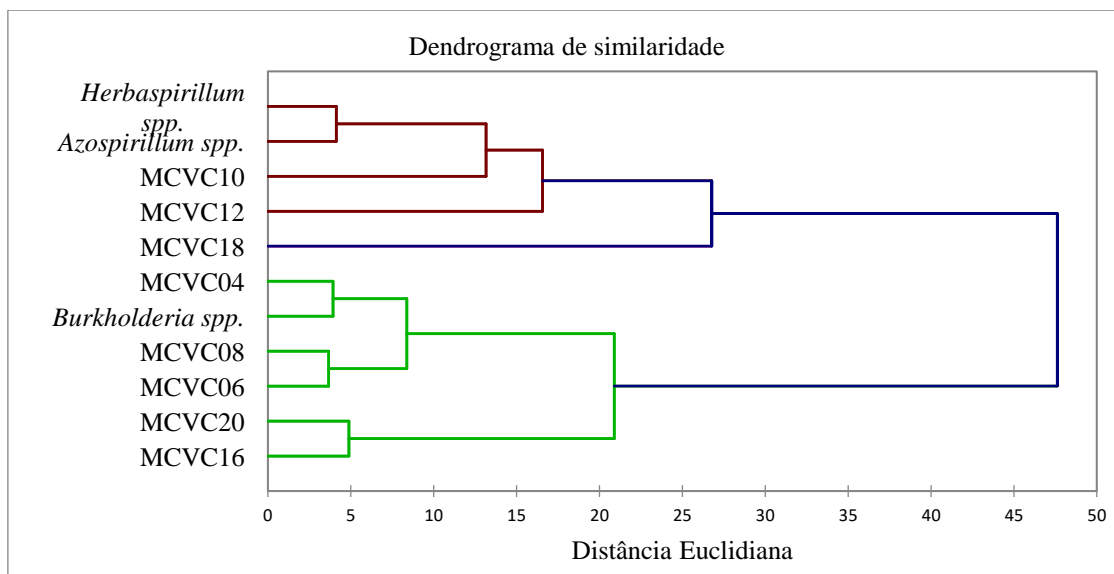


**Figura 1-** Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas pelo método de separação euclidiana de isolados bacterianos de *coffea arabica* da variedade Catuaí vermelho IAC 144. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum spp.* e *Burkholderia spp.*

Ao analisar o Dendrograma observa-se que na menor distância euclidiana, dos 12 isolados encontrados na variedade Catuaí, 41,7% se assemelham aos padrões de *Burkholderia spp.* (MCVC01, MCVC05, MCVC09, MCVC11, MCVC13) o que era esperado já que quase todos os isolados foram obtidos a partir do meio JMV, comumente utilizado ao isolar bactérias desse gênero.

Nota-se ainda um isolado agrupado como pertencente aos gêneros *Azospirillum spp.* e *Herbaspirillum spp.* (MCVC14) e seis isolados que não se assemelharam com nenhum dos padrões estabelecidos (MCVC02, MCVC03, MCVC07, MCVC15, MCVC17, MCVC19).

Ao analisar o dendrograma para a variedade Catucaí (Figura 2), nota-se que o padrão *Burkholderia spp.*(meio JMV) foi o que se assemelhou ao maior número de isolados e são os que mais se aproximam de acordo com a distância euclidiana, representando 62,5% do total de 8 isolados encontrados para essa variedade (MCVC04, MCVC06, MCVC08, MCVC16, MCVC20), entretanto, dois desses isolados, MCVC16 e MCVC20, foram obtidos nos meios JNFb e NFb, respectivamente.



**Figura 2-** Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas pelo método de separação euclidiana de isolados bacterianos de *coffea arabica* da variedade Catucaí amarelo 2SL. Os isolados foram comparados com estirpes-tipo de *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum spp.* e *Burkholderia spp.*

A análise do dendrograma indicou que existem alguns isolados com alta semelhança, quando na verdade, foram obtidos de outros meios que selecionam bactérias pertencentes a outros gêneros, como exemplo tem-se os isolados MCVC10 e MCVC12, agrupados como sendo dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, entretanto, foram isolados do meio JMV, que se assemelha aos padrões de *Burkholderia spp.* Nota-se ainda, um isolado (MCVC18) que não se assemelhou com nenhum dos padrões estabelecidos, apresentando uma grande distância euclidiana.

Em princípio, os resultados mostram que a alta diversidade fenotípica e a baixa similaridade dos isolados, demonstram bactérias diferentes. A formação de película aerotóxica de crescimento em todos os isolados apresentou o indicativo de fixação biológica de nitrogênio, e o gênero que se caracteriza por esse mecanismo é o *Azospirillum spp.*, resultados diferentes ao verificado no presente estudo.

Considerando os padrões morfológicos, diante dos resultados encontrados na análise do dendrograma, é possível observar que é uma técnica para criar grupos através da comparação das semelhanças entre os isolados, pois trata-se de um método qualitativo de classificação, e o resultado pode variar conforme descrito e observado, além de que gêneros e espécies diferentes podem apresentar características morfológicas semelhantes (Paz, 2009).

### 3.3 Caracterização Fisiológica

#### 3.3.1 Potencial de fixação de Nitrogênio *in vitro*

Todos os 20 isolados foram capazes de crescer e formar película em todos os meios de cultura semissólido (JMV, JNFb e NFb) sem adição de nitrogênio após sucessivas repicagens, sendo um indicativo de que esses isolados podem promover a fixação biológica de nitrogênio.

O meio JMV que facilita o isolamento de bactérias do gênero *Burkholderia* foi o que apresentou mais representantes entre os fixadores de N para as duas variedades de café, seguido pelos meios JNFb e NFb, que selecionam bactérias que se assemelham aos padrões de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum* spp, respectivamente.

#### 3.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Para a solubilização de fosfato inorgânico, 65% das bactérias foram capazes de formar halo em torno das colônias e apenas o isolado MCVC01 apresentou alto índice de solubilização final (IS = 4,45) aos 15 dias de avaliação. Seis apresentaram índice de solubilização médio (MCVC07, MCVC15, MCVC16, MCVC18, MCVC20), sete foram classificados com baixa solubilização (MCVC02, MCVC05, MCVC06, MCVC08, MCVC11, MCVC13 e MCVC17) e os demais não apresentaram solubilização aparente no período de 15 dias de avaliação (Tabela 4).

**Tabela 4** - Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio por 20 isolados bacterianos de duas variedades de café, Catuaí vermelho IAC 144 e Catuaí amarelo 2SL.

Isolados	Início da solubilização (dia)	Capacidade de solubilização	P – Ca		Solubilização
			IS		
			Inicial	Final	
MCVC01	3	Precoce	1,69	4,45	Alta
MCVC 02	6	Tardia	1,28	1,40	Baixa
MCVC 03	-	NSA	-	-	-
MCVC 04	-	NSA	-	-	-
MCVC 05	6	Tardia	1,34	1,59	Baixa
MCVC 06	9	Tardia	1,41	1,59	Baixa
MCVC 07	6	Tardia	1,82	2,07	Média
MCVC 08	9	Tardia	1,55	1,94	Baixa

MCVC 09	-	NSA	-	-	-
MCVC 10	-	NSA	-	-	-
MCVC 11	6	Tardia	1,76	1,80	Baixa
MCVC 12	-	NSA	-	-	-
MCVC 13	6	Tardia	1,58	1,79	Baixa
MCVC 14	-	NSA	-	-	-
MCVC 15	6	Tardia	1,86	2,14	Média
MCVC 16	6	Tardia	2,00	2,15	Média
MCVC 17	6	Tardia	1,55	1,71	Baixa
MCVC 18	3	Precoce	1,46	3,36	Média
MCVC 19	-	NSA	-	-	-
MCVC 20	6	Tardia	1,71	2,26	Média

NSA= Não solubilizadora aparente

Dentre os isolados capazes de solubilizar o fosfato de Cálcio, 3 (14,3%) se comportaram como precoces, cujo crescimento foi verificado até o terceiro dia de incubação (MCVC01 e MCVC18), e 11 isolados (52,4%) tiveram seus crescimentos classificados como tardios (MCVC02, MCVC05, MCVC06, MCVC07, MCVC08, MCVC11, MCVC13, MCVC15, MCVC16, MCVC17, MCVC20). Os demais isolados não apresentaram capacidade de solubilização no período de 15 dias de avaliação (MCVC03, MCVC04, MCVC09, MCVC10, MCVC14, MCVC19).

Segundo Khan et al. (2010), os microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos, estes disponibilizam o fosfato até então insolúvel as plantas e as plantas por meio de suas raízes disponibilizam ricas fontes de carbono, em especial açúcares e ácidos orgânicos, fundamentais para o crescimento bacteriano.

O fósforo é considerado o macronutriente mais limitante para a produção agrícola devido às perdas por adsorção nas partículas do solo, e a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato ou o manejo da população destes microrganismos em culturas agronomicamente importantes, como é o caso do café, traz grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, devido à capacidade de solubilizar fontes de fosfatos inorgânicos insolúveis aumentando o conteúdo de fósforo solúvel na solução do solo (Souchie et al., 2005).

Como relatado na literatura, o fosforo aumenta a quantidade de pelos radiculares, favorecendo mais sítios de infecção para os microrganismos diazotróficos, além de contribuir para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), essencial no funcionamento da enzima nitrogenase e na FBN. O P é um nutriente indispensável às plantas, participando

como componente estrutural dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP, sendo um elemento chave de vias metabólicas, bioquímicas e particularmente importante para a FBN (Richardson e Simpson, 2011).

Cisneros et al. (2016) testaram microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Kocuria* sp. e *B. subtilis*, para verificar seu potencial como promotores de crescimento em café, e eles observaram que a solubilização de fosfato por essas bactérias demonstrou ser um mecanismo importante para a planta, melhorando a disponibilidade de P e alguns nutrientes como é o caso do N para as mudas de café em um solo localizado em Palmira, na Colômbia.

O potencial das bactérias em solubilizar fosfato também foi verificado em um estudo realizado no sudoeste da Etiópia por Mulleta et al. (2013), onde eles observaram que mais de 72% das rizobactérias foram capazes de solubilizar o P mineral.

### 3.3.3 Produção de ácido indolacético (AIA)

Dos 20 isolados bacterianos para a produção de AIA a partir do triptofano, os dados mostraram que 100% foram promissores para essa atividade, cujos valores variaram entre 60,08 a 67,02  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para os isolados MCVC20 e MCVC01, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5** – Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos de café, quanto à produção de compostos indólicos.

Isolados	Ácido indolacético ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
MCVC01	67,02
MCVC 02	63,36
MCVC 03	62,63
MCVC 04	63,78
MCVC 05	61,90
MCVC 06	62,05
MCVC 07	62,34
MCVC 08	62,53
MCVC 09	60,67
MCVC 10	61,54
MCVC 11	61,82
MCVC 12	61,43
MCVC 13	63,12
MCVC 14	60,68
MCVC 15	61,88

MCVC 16	61,52
MCVC 17	63,77
MCVC 18	62,32
MCVC 19	61,54
MCVC 20	60,08

---

Etesami, Alikhani e Hosseini (2015) relataram que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são aptas a produzir AIA, o que favorece o crescimento das plantas, devido à presença de triptofano nos exsudatos liberados pelas raízes, estimulando a síntese de auxina na rizosfera (Bogas et al., 2016). De acordo com Cassán et al. (2014), em condições de cultivo, a produção de AIA pode variar de 5 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , dependendo do meio de cultivo e da estirpe testada. Por outro lado, Bashan e de-Bashan (2010) reportaram elevada capacidade de bactérias *A. brasilense* para produzir AIA, variando de 93 a 379  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

No presente estudo, considerando a mesma unidade ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) o isolado MCVC01 produziu 67,02  $\mu\text{g. ml}^{-1}$  de AIA, cujo valor é bastante superior ao encontrado por Madhaiyan et al. (2004), avaliando amostras de plantas de *Coffea arabica* em diversas regiões geográficas do distrito de Nilgiris, situado no sul da Índia e foram identificados quatro isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* dos tecidos da raiz de café, com síntese de AIA na presença do triptofano, equivalente a 1,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  com glicose e 1,55  $\mu\text{g ml}^{-1}$  com sacarose.

El-Khawas e Adachi (1999) observaram que na presença de concentrações ótimas de células das espécies de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae* ocorria um aumento significativo do comprimento radicular, área, massa seca e desenvolvimento lateral de raízes e pelos radiculares em café.

Esses resultados demonstram que estes microrganismos são uma fonte com potencial para a aplicação biotecnológica em diferentes áreas, caracterizados como promotores de crescimento vegetal. Esse mecanismo favoreceu a maior síntese de compostos nitrogenados, pelo aumento na atividade da redutase do nitrato, quando crescem endofiticamente nas plantas, além da produção de hormônios, como auxinas e solubilização de fósforo, como elucidado por Hungria (2011), que, revisando vários autores, conceituou as BPCV como grupo de microrganismos benéficos às plantas, devido à sua capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas.

Observou-se no presente estudo que a síntese de AIA proporcionou efeito benéfico para o crescimento da raiz, o que pode estar atribuído ao maior acesso à água e nutrientes do solo. Esse hormônio possui influência principalmente no sistema radicular; pode promover o alongamento das raízes principais, estimular a emissão de raízes secundárias e pelos absorventes e, ainda, expressar acúmulo de massa sobre os componentes da raiz (Hungria, 2011).

### 3.4 Eficiência das bactérias em promover o crescimento de mudas de café

Os resultados obtidos para massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR) e número de folhas da variedade Catuaí IAC 144, não apresentaram diferença significativa quando as mudas foram inoculadas com BPCV quando comparadas à Testemunha (Tabela 6).

**Tabela 6-** Avaliação de crescimento de mudas de café variedade Catuaí vermelho IAC 144 inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, avaliadas aos 75 dias após o plantio em vasos ao ar livre.

Trat	Diâmetro	Altura	MFR	MFPA	MSR	MSPA	NUF
	-----cm-----		-----gramas-----				
T1	0,4 b	22,2 b	22,0 a	12,2 b	3,8 a	4,2 b	18 a
MCVC01	0,6 a	24,2 a	34,8 a	28,7 a	5,9 a	9,6 a	23 a
MCVC02	0,6 a	32,1 a	37,8 a	26,7 a	5,6 a	8,9 a	21 a
MCVC03	0,6 a	30,5 a	26,4 a	23,4 a	4,4 a	8,0 a	24 a
MCVC05	0,6 a	29,9 a	29,0 a	25,4 a	5,0 a	9,1 a	20 a
MCVC07	0,6 a	36,5 a	38,0 a	26,9 a	5,9 a	8,6 a	21 a
MCVC09	0,6 a	32,2 a	35,1 a	29,5 a	5,6 a	9,8 a	21 a
MCVC11	0,6 a	35,9 a	34,5 a	28,1 a	5,8 a	9,2 a	20 a
MCVC13	0,6 a	31,7 a	31,0 a	25,5 a	4,9 a	8,6 a	20 a
MCVC14	0,6 a	36,3 a	37,0 a	31,9 a	6,2 a	10,5 a	23 a
MCVC15	0,6 a	31,4 a	34,0 a	29,4 a	5,4 a	9,6 a	24 a
MCVC17	0,6 a	34,4 a	38,8 a	31,5 a	6,1 a	9,9 a	23 a
MCVC19	0,6 a	31,4 a	32,8 a	25,9 a	5,1 a	8,8 a	19 a
Cv (%)	16,8	12,46	32,5	29,8	24,7	28,5 a	18

MFR= massa fresca da raiz; MFPA= massa fresca parte aérea; MSR = massa seca da raiz; MSPA = massa seca parte aérea; NUF= número de folhas; CV (%) = coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Entretanto, embora não significativos estatisticamente, houve incremento no crescimento das mudas inoculadas quando comparado ao controle, em MFR o isolado MCVC17 apresentou resposta superior de 76,36%, em número de folhas (NUF) o isolado

MCVC15 teve 33,33%, e em MSR o isolado MCVC14 apresentou 63,15% de incremento em relação à testemunha.

Já para as variáveis diâmetro, altura, massa fresca de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) observa-se que todos os isolados foram estatisticamente iguais entre si, diferindo apenas da testemunha. Houve incremento significativo de 50, 63, 62 e 150%, respectivamente, em relação à testemunha quando se utilizou o isolado MCVC14.

Isso evidencia que a inoculação com os isolados favoreceu o crescimento das mudas em relação ao tratamento sem inoculação, podendo ser isolados indicados para a utilização como promotores de crescimento em café. A contribuição da fixação biológica para a nutrição da planta, ou a produção de hormônios pela bactéria, como verificado na Tabela 5 por meio da produção de auxina (Okon e Vanderleyden, 1997) também pode ter favorecido a planta na absorção dos nutrientes presentes no solo no período experimental.

Sendo assim, é possível que as alterações morfológicas (altura de planta, MFPA e MSPA) nas plantas inoculadas tenham ocorrido em função da planta ter acumulado maior teor de N nas folhas devido a contribuição da FBN. De acordo com Fukami et al. (2017), as bactérias podem favorecer a nutrição nitrogenada das culturas, incrementando a capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o crescimento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N das plantas, levando ao incremento de massa seca de raiz, de modo a reduzir gastos com adubações nitrogenadas e tornando o sistema sustentável. O N é o elemento que mais limita o crescimento vegetal e a sua baixa disponibilidade está associada a redução da divisão e expansão celular, da área foliar e da fotossíntese (Chanway et al., 2014).

Outro fator que pode estar associado aos maiores incrementos para as variáveis diâmetro, altura, MFPA e MSPA, consiste no alongamento da raiz primária e de pelos radiculares pelas BPCV (Hari e Srinivasan, 2005; Gosal et al., 2012), favorecendo uma maior superfície de contato com o solo o que permite captar mais água e nutrientes, auxiliando no crescimento da planta, por mais que a MFR e MSR não diferiram estatisticamente da testemunha.

Resultados encontrados por Pimentel et al. (2008) estudando o desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, corroboram com o presente estudo, nos quais os autores observaram que a massa seca de folhas aumentou significativamente quando inoculadas com a bactéria *A. brasilense* e que a inoculação promoveu um incremento de 27% na biomassa das folhas de café variedade



Icatu em relação a testemunha sem inoculação. Isso pode ser atribuído à capacidade de promoção de crescimento vegetal por meio da FBN, o que favoreceu o aumento na massa seca de folhas.

O diâmetro das plantas foi superior a testemunha, quando inoculadas com quase todos os isolados bacterianos, exceto para o isolado MCVC04, que foi estatisticamente igual à testemunha. As mudas de café obtiveram valores de altura semelhante entre os isolados, diferindo apenas da testemunha com resultado bastante inferior (Tabela 7).

Apesar da massa fresca e massa seca de raiz, não apresentarem variação estatisticamente significativa em nenhum dos tratamentos, observa-se que há um incremento de 76 e 68% para essas duas características quando se utilizou o isolado MCVC08, respectivamente.

**Tabela 7-** Avaliação de crescimento de mudas de café variedade Catucaí amarelo 2SL inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, avaliadas aos 75 dias após o plantio em vasos ao ar livre.

Trat	Diâmetro	Altura	MFR	MFPA	MSR	MSPA	NUF
	-----cm-----		-----gramas-----				
T2	0,4 b	24,2 b	23,5 a	14,4 c	4,0 a	4,9 c	17 a
MCVC04	0,5 b	36,5 a	33,7 a	25,6 a	5,1 a	8,6 a	23 a
MCVC06	0,6 a	35,9 a	32,7 a	26,1 a	5,2 a	9,0 a	23 a
MCVC08	0,6 a	36,3 a	41,4 a	32,6 a	6,7 a	11,2 a	26 a
MCVC10	0,6 a	34,4 a	29,2 a	22,3 b	4,4 a	7,6 b	21 a
MCVC12	0,6 a	37,8 a	34,7 a	29,9 a	5,5 a	10,5 a	24 a
MCVC16	0,6 a	35,3 a	33,7 a	27,2 a	5,6 a	9,4 a	25 a
MCVC18	0,6 a	33,1 a	30,5 a	23,1 b	5,0 a	7,8 b	22 a
MCVC20	0,6 a	36,7 a	34,7 a	32,5 a	5,6 a	10,3 a	25 a
%Cv	14,2	7,2	27,2	23,8	27,2	24,4	23

MFR= massa fresca da raiz; MFPA= massa fresca parte aérea; MSR = massa seca da raiz; MSPA = massa seca parte aérea; NUF= número de folhas; CV (%) = coeficiente de variação. Médias na coluna seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Embora sem diferença significativa, o número de folhas com o uso do isolado MCVC08 também proporcionou um incremento em relação a testemunha (T2), de 53%, o que equivale a um aumento expressivo na área fotossintética da planta, podendo resultar em maior disposição de carboidratos e crescimento da planta, acarretando em maior diâmetro, altura, quantidade de massa seca e fresca de raiz e parte aérea, com a utilização dessa mesma bactéria.

Por fim, a massa fresca e seca da parte aérea das plantas apresentou resultados significativos, com maiores valores para todos os isolados em relação à testemunha. Os

maiores valores foram obtidos quando houve a associação com os isolados MCVC04, MCVC06, MCVC08, MCVC12, MCVC16 e MCVC20. Além disso, o isolado MCVC08 se destacou para ambas as características e proporcionou um aumento de 126,4 e 128,6%, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 5). Já os menores valores para dadas características foram observados ao se utilizar os isolados MCVC10 e MCVC18, porém os resultados ainda foram superiores à testemunha.

Diante dos resultados é preciso salientar a interdependência fisiológica entre o sistema radicular e a parte aérea da planta, uma vez que, as folhas participam fornecendo todos os compostos orgânicos primordiais para o desenvolvimento, e as raízes, como fonte principalmente de nutrientes minerais, água e fitormônios, todos indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Assim, taxas de crescimento de parte aérea maiores podem ser favorecidas pelo sistema radicular.

Dessa forma, a introdução de bactérias promotoras de crescimento vegetal em mudas de café, surge como uma alternativa viável para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com maiores ganhos, pois promove um melhor e mais rápido crescimento das plantas ao se diminuir o tempo de formação das mudas, reduzindo-se o custo de produção, visto que, os custos de manutenção das mudas nos viveiros durante meses até o seu plantio definitivo no campo, pode ser acelerado, reduzindo assim os custos operacionais, além de aumentar a porcentagem de pegamento das mudas e estabelecimento das mesmas no campo.

#### **4. Conclusões**

1. As variedades respondem diferentemente à inoculação com bactérias promotoras de crescimento. Os isolados encontrados na variedade Catucaí amarelo 2SL, promoveram respostas diferentes para algumas características avaliadas quando comparadas a variedade Catuaí vermelho IAC 144
2. Todos os isolados de ambas as variedades são promotores de crescimento por meio da fixação biológica de nitrogênio e o gênero *Burkholderia* agrupou um maior número de isolados.
3. Todos os isolados promovem incrementos em mudas de café para as variáveis diâmetro, altura, massa fresca e massa seca de parte aérea, com destaque para o isolado MCVC14 para a variedade Catuaí e MCVC08 para a variedade Catucaí.

## Referências

- Abedinzadeh, M., Etesami, H., Alikhani, H. A. (2019) Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnol Rep* **21**: 1–14.
- ABIC-Associação Brasileira Da Indústria De Café (2021). Mercado do café no Brasil. Disponível em: < <http://abic.com.br/estatisticas/exportacoes/>>. Acesso em: 20 julho 2021.
- Addinsoft (2020) **Xlstat, Statistical software and data analysis**. New York, NY: Addinsoft.
- Baldani, JI, Reis, VM, Videira, SS, Boddey, LH, Baldani, VLD (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* **384**: 413-431.
- Bogas, AC, Ferreira, AJ, Araujo, WL, Astolfi Filho, S. (2015) Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. *SpringerPlus* **4**: n. 1.
- Caldwell, AC, Silva, LCF, Silva, CC, Ouverney, CC (2015) Prokaryotic Diversity in the Rhizosphere of Organic, Intensive, and Transitional Coffee Farms in Brazil. *Plos One* **10**: 1–17.
- Cassetari, AS (2015) Fixação Biológica de Nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 162 p. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-15042015-152624/publico/Alice\\_de\\_Souza\\_Cassetari\\_versao\\_revisada.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-15042015-152624/publico/Alice_de_Souza_Cassetari_versao_revisada.pdf) > Acesso em: 17 junho 2022.
- Castellanos, DMO, Zabala, LBB, Botía, DMR, Garrido, MFR, Baldani, VLD, Buitrago, RRB (2010) Caracterización De Bacterias Diazotróficas Asimbióticas Asociadas Al Eucalipto (*Eucalyptus* Sp.) En Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta biol Colomb* **15**: 107 – 120.
- Chanway, CP, Anand, R., Yang, H (2014) Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, 3–22.
- Cisneros R, CA, Sánchez De P, M., Menjivar F, JC (2016) Influencia de microorganismos solubilizadores de fósforo del suelo y su absorción por plántulas de café. *Bioagro* **28**: 95-106.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zuniga, D., Guillén, C. (2012) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *olea europea* “olivo” en tacna Perú. *Appl Ecol* **11**: 89-102.
- Da Silveira, APD, Iório, RPF, Marcos, FCC, Fernandes, AO, Souza, SACD, Kuramae, EE, Cipriano, MAP (2019) Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**: 283–295.
- Döbereiner, J., Baldani, VLD, Baldani, JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília, 60 p.
- Etesami, H., Alikhani, HA, Hosseini, HM (2015) Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* **2**: 72–78.

- Fukami, J., Ollero, FJ, Megías, M., Hungria, M (2017) Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* **7**: p.153-163.
- Gosal, SK, Kalia, A., Uppal, SK, Kumar, R., Walia, SS, Singh, K., Singh, H (2012) Assessing the benefits of *Azotobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. *Sugar Tech* **14**: 61-67.
- Hara, FAZ, Oliveira, LA (2005) Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq Agropec Bras* **40**: 667-672.
- Hari, K., Srinivasan, T. (2005) Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. *Sugar Tech* **7**: 28-31.
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, DVan, Berg, G. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**: 235–257.
- Hungria, M., Silva, K. (2011) Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Documentos 332. Embrapa. Brasília: Distrito Federal. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/933488> Acessado em: 17 junho 2022.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L. E, Martinez-Romero, E. E, Caballero-Mellado, J., 1997. *Coffea arabica*, a new host plant for *A.diazotrophicus* and isolation of others nitrogen fixing acetobacteria. *Applied Environ. Microbiol.* 63, 3676-3683. doi: 10.1128/aem.63.9.3676-3683.1997
- Jiménez-Salgado, T., Vásquez-Chávez, L., Tapiahernández, A., Mascarúa-Esparza, MA, Rosasmorales, M., Fuentes-Ramírez, LE. Response of the *coffee* plant to the inoculation with *Azospirillum* sp. In: Finan, TM, O'Brian, MR, Layzell, DB, Vessey, JK, Newton, W. (Ed.). **Nitrogen fixation; global perspectives**. Oxon: CABI, 2002. p.497.
- Khan, M., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P., 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Sci.* 56, 73-98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
- Lindown, E. S., Brandl, M. T., 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied Environ. Microbiol.* 69, 1875-1883. [10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003)
- Madhaiyan, M., Saravanan, V., Jovi, D., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K., Sa, T., 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats. *Microbiol res.* 159, 233-43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.04.001>
- Matiello, E. M., Pereira, M.G., Zonta, E., Mauri, J., Matiello, J. D., Meireles, P. G., Silva, I. R., 2008. Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canéfora* e *Coffea arabica* sob influência da atividade do alumínio em solução. *Rev Bras Ciênc Solo.* 1, 425-434. [10.1590/S0100-06832008000100040](https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000100040)
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E., Granhall, U., 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Saudi Soc Agric Sci.* 12, 73– 84. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.07.002>

- Nautiyal, C., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170, 265-270. [10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x)
- Organização Internacional do Café – OIC (2021). Relatório sobre o mercado de Café. [https://www.ico.org/pt/about\\_statistics\\_p.asp?section=Estat%EDstica](https://www.ico.org/pt/about_statistics_p.asp?section=Estat%EDstica) (accessed, June, 17, 2022).
- Okon, Y., Vanderleyden, J., 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate 48 plants. *Applied Environ. Microbiol* 6, 366-370. [https://kuleuven.limo.libis.be/discovery/fulldisplay?docid=lirias1759148&context=SearchWebhook&vid=32KUL\\_KUL:Lirias&lang=en&search\\_scope=lirias\\_profile&adaptor=SearchWebhook&tab=LIRIAS&query=any,contains,lirias1759148](https://kuleuven.limo.libis.be/discovery/fulldisplay?docid=lirias1759148&context=SearchWebhook&vid=32KUL_KUL:Lirias&lang=en&search_scope=lirias_profile&adaptor=SearchWebhook&tab=LIRIAS&query=any,contains,lirias1759148)
- Paz, ICP (2009) Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 129f. <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/21638/000737948.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Pimentel, M. S., Ricci, M. S. F., Costa, J. R., Reis, V. M., Santos, V. L. S, Silva, M. S., 2008. Desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento. *R. Bras. Agrociência*. 14, 221-230. <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/1905>
- Ribeiro, N. V. S., 2018. Estudo da atividade funcional de bactérias diazotróficas e o potencial de uso como biofertilizante em genótipos de *Brachiaria*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 182f. <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/4877>. (accessed, June, 17, 2022).
- Santos, M. L Dos, Berlitz, D., Wiest, S. L. F., Schünemann, R., Knaak, N., Fiuza, L. M., 2018. Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Braz Arch Biol Technol*. 61, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160431>
- Santos, RKA (2019) Isolamento, caracterização e seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal em eucalipto. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista. 104 f. <http://www2.uesb.br/ppg/ppgagronomia/wp-content/uploads/2020/10/TESE-Rayka-Kristian-Alves-Santos.pdf> . (accessed, June, 17, 2022).
- Silva, TR Da, Carvalho, BR, Santos, JMR Dos, Silva, JF Da, Fernandes Junior, PI (2017) Caracterização molecular e capacidade de promoção do crescimento vegetal de bactérias diazotróficas isoladas do Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Iniciação Científica da Embrapa Semiárido* 305–311. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1073371/caracterizacao-molecular-e-capacidade-de-promocao-do-crescimento-vegetal-de-bacterias-diazotroficas-isoladas-do-sorgo-sorghum-bicolor-l-moench>. (accessed, June, 17, 2022).
- Shen, F. T., Yen, J. H., Liao, C. S., Chen, W. C., Chao, YT., 2019. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. *Sustainability* (Switzerland). 11, 1-13. <https://doi.org/10.3390/su11041133>
- Souchie, E. L., Abboud, A. C. S., Caproni, A. L., 2007. Solubilizadores de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. *Biosci J*. 23, 53-60. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-469386>

- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., Murphy, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- Rodriguez, C. V., Hernandez, M. J. M., 2010. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*physalis peruviana* L.) Con capacidad antagónica frente a *fusarium* sp. Tese (Doutorado em microbiologia industrial) - Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 182f. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8471>. (accessed, June, 17, 2022).
- Videira, S. S., Silva, M. D. C. P., Souza-Galisa, P., Dias, A. C. F., Nissinen, R., Baldani, V. L. D., 2013. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum* - a bioenergy crop. Plant Soil 373, 737-754. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1828-4>
- Vorholt, J. A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. Nat rev microbiol. 10, 828-840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>

**ARTIGO II**

Bactérias diazotróficas isoladas de variedades de *Coffea arabica* L. com potencial para promoção de crescimento vegetal\*

---

\* **Situação:** Não submetido

## **Bactérias diazotróficas isoladas de variedades de *Coffea arabica* L. com potencial para promoção de crescimento vegetal**

**Maida Cynthia Duca de Lima<sup>1</sup>. Joilson Silva Ferreira<sup>2</sup>. Rayka Kristian Alves Santos<sup>3</sup>.**

**Elismar Pereira de Oliveira<sup>1</sup>. Joseani Santos Ávila<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

<sup>2</sup>Professor Titular do Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

<sup>3</sup> Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

**RESUMO** - A utilização de plantas de alta qualidade, na fase inicial, é fundamental para o estabelecimento de cultivos bem-sucedidos, especialmente tratando-se de culturas perenes, como o café. Este trabalho tem por objetivo avaliar e selecionar bactérias capazes de promover o crescimento de mudas de café, previamente selecionadas *in vitro*. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Foram conduzidos dois experimentos independentes com duas variedades de *Coffea arabica* L, Catuaí vermelho IAC 144 e Catucaí amarelo 2SL, a fim de selecionar os melhores isolados bacterianos para promover o crescimento de mudas de café. Obteve-se 20 isolados, 12 para a variedade Catuaí e 8 para a variedade Catucaí. Para a montagem do primeiro experimento com a variedade Catuaí, adotou-se o delineamento em blocos casualizados, cujos tratamentos foram constituídos por 12 isolados bacterianos e 1 controle sem inoculação, totalizando 13 tratamentos com 5 repetições, perfazendo 65 parcelas. Já para o segundo experimento com a variedade Catucaí, adotou-se o mesmo arranjo experimental, por meio da utilização de 8 isolados e 1 testemunha, totalizando 45 parcelas. Aos 45 dias, avaliou-se a altura das plantas, diâmetro, proporção entre parte aérea e raiz, índice SPAD, massa seca de raiz e de folhas e número de folhas. Os isolados MCVC07, MCVC15, MCVC17 e MCVC19 favoreceram as melhores respostas para o crescimento de mudas de café para a variedade Catuaí; e, para a variedade Catucaí, as melhores respostas foram obtidas com os isolados MCVC04, MCVC06, MCVC12 e MCVC16. O uso das BPCV apresenta-se como excelente alternativa no desenvolvimento e crescimento inicial de mudas de café.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio. Isolados Bacterianos. Promoção de Crescimento.

**ABSTRACT:** The use of high quality plants in the initial phase is essential for the establishment of successful crops, especially in the case of perennial crops such as coffee. This work aims to evaluate and select bacteria capable of promoting the growth of coffee seedlings, previously selected *in vitro*. The work was carried out at the State University of Southwest Bahia. Two independent experiments were carried out with two varieties of *Coffea arabica* L, Catuaí vermelho IAC 144 and Catucaí amarelo 2SL, in order to select the best bacterial isolates to promote the growth of coffee seedlings. Twenty isolates were obtained, 12 for the Catuaí variety and 8 for the Catucaí variety. To set up the first



experiment with the Catuaí variety, a randomized block design was adopted, where the treatments consisted of 12 bacterial isolates and 1 control without inoculation, totaling 13 treatments with 5 replications, totaling 65 plots. For the second experiment with the Catucaí variety, the same experimental arrangement was adopted, using 8 isolates and 1 control, totaling 45 plots. At 45 days, plant height, diameter, shoot to root ratio, SPAD index, root and leaf dry mass and number of leaves were evaluated. The isolates MCVC07, MCVC15, MCVC17 and MCVC19 favored the best responses for the growth of coffee seedlings for the Catuaí variety and for the Catucaí variety, the best responses were obtained with the isolates MCVC04, MCVC06, MCVC12 and MCVC16. The use of BPCV present themselves as an excellent alternative in the development and initial growth of coffee seedlings.

**Keyword:** Biological Nitrogen Fixation. Bacterial Isolates. Select.

## 1 INTRODUÇÃO

O café, por ser uma das culturas mais importantes no cenário econômico nacional, é potencialmente atrativo do ponto de vista comercial, sendo o Brasil seu maior produtor, maior exportador e segundo maior consumidor mundial de café, produzindo cerca de 8,1 bilhões de dólares na safra 2021/2022. Durante esse período, o Brasil exportou 39,6 milhões de sacas e consumiu 21,61 milhões de sacas, de acordo com os dados da Organização Internacional do Café (OIC, 2022).

Para que se alcance elevadas produtividades nos cafeeiros, a qualidade das mudas é fator de grande importância, principalmente, nos primeiros meses após o plantio, quando elas são submetidas às condições ambientais mais adversas do que aquelas preponderantes nos viveiros (Grossnickle, 2012). Portanto, faz-se necessário que as mudas cheguem a campo em perfeitas condições para o plantio, com sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos para melhor aproveitamento da água e dos nutrientes minerais do solo, conduzindo a uma maior tolerância a condições de deficiência hídrica, situação essa cada vez mais recorrente.

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) surge como uma alternativa viável por melhorar a performance produtiva das plantas (Oliveira *et al.*, 2015; Grady *et al.*, 2016). Além disso, a utilização dessas bactérias pode significar aumento na germinação, rendimento de grãos, redução de doenças e melhoria do crescimento da planta em culturas como: soja, feijão, algodão, milho, sorgo, arroz, tomate, morango, café, entre outras culturas, o que torna o produto diferenciado e eleva a competitividade no mercado, com custos reduzidos para o produtor (Osório Filho *et al.*, 2014; Mareque *et al.*, 2015; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2015).

A fim de elucidar essas ações e comprovar a eficiência da inoculação, buscando a promoção de crescimento das plantas, os ensaios com isolados bacterianos são necessários. A inoculação de bactérias promotoras de crescimento pode ser realizada de diversas formas, aplicadas como inoculante líquido, turfoso, granulado, com uso de material orgânico, material inorgânico, aplicação direta no sistema radicular, sementes, hastes ou miniestacas.

Apesar de ser uma atividade econômica importante, pouco se sabe sobre a composição da comunidade bacteriana associada ao solo dos cafezais e como essa comunidade se comporta, porém, alguns estudos de inoculação de bactérias em mudas de café mostram o potencial desses microrganismos como promotores de crescimento das plantas. Silva *et al.* (2012) constataram o uso de bactérias endofíticas no controle da ferrugem em folhas; Sakiyama (2001) e Sakiyama *et al.* (2003) confirmam maior desenvolvimento de explantes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* em mudas inoculadas; Silva, Barbosa e Franco Junior (2020) e Ricci *et al.* (2005) observaram que, com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, obtiveram maior crescimento da raiz principal e maior quantidade de massa fresca de raiz, e aumento no crescimento e maior acúmulo de nutrientes nas mudas, respectivamente.

Diante disso, o presente trabalho visou avaliar e selecionar bactérias que promovam o crescimento em plantas de duas variedades de café, por meio da inoculação dos isolados previamente selecionados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Seleção das bactérias**

Para selecionar os isolados bacterianos que promovem o crescimento em mudas de café, foram conduzidos dois experimentos independentes, um para a variedade Catuaí vermelho IAC 144 e o outro para a variedade Catucaí amarelo 2SL. Os experimentos foram montados ao ar livre, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Vitória da Conquista – BA, utilizando mudas com idade de 120 dias.

As mudas foram plantadas em vasos plásticos, com capacidade de 14 litros, e o solo utilizado foi característico da região do *campus* da UESB - Vitória da Conquista,

com as características químicas: pH em H<sub>2</sub>O 4,9; P 1 mg dm<sup>-3</sup>; Ca 0,4 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg 0,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al 0,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, V 19 %. As adubações de potássio e fósforo foram equivalentes a 5 e 83 g/vaso de cloreto de potássio (KCL) e superfosfato simples, respectivamente, de acordo com as recomendações da 5ª Aproximação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Alvarez e Ribeiro, 1999).

Para a implantação do primeiro experimento com a variedade Catuaí vermelho IAC 144, adotou-se o delineamento em blocos casualizados, cujos tratamentos foram constituídos por 12 isolados bacterianos e 1 testemunha sem inoculação, totalizando 13 tratamentos com 5 repetições, perfazendo 65 parcelas.

Já o segundo experimento foi implantado utilizando-se a variedade Catucaí amarelo 2SL e adotando o mesmo arranjo experimental do primeiro experimento, delineamento em blocos casualizados, por meio da utilização de 8 isolados e 1 testemunha (sem inoculação), totalizando 45 parcelas.

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio *Dygs* líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 5 ml da solução bacteriana adicionados diretamente em contato com a raiz, antes do plantio. Todos os isolados foram padronizados com uma população de 10<sup>9</sup> u.f.c. por ml.

Foram utilizados os isolados: MCVC01, MCVC02, MCVC03, MCVC05, MCVC07, MCVC09, MCVC11, MCVC13, MCVC14, MCVC15, MCVC17 e MCVC19, para a variedade Catuaí vermelho IAC 144; e os isolados MCVC04, MCVC06, MCVC08, MCVC10, MCVC12, MCVC16, MCVC18 e MCVC20, para a variedade Catucaí amarelo 2SL.

Ao fim dos 45 dias, foi avaliada a altura (cm) das plantas e comprimento de raiz (CPR) com auxílio de régua graduada, o diâmetro (mm) com uso de paquímetro digital, proporção entre parte aérea e raiz (PA/R), a contagem do número de folhas, mediu-se o índice SPAD utilizando-se um clorofilômetro marca Opti-sciences, modelo CCM/200, cuja avaliação foi realizada em três folhas completamente expandidas e fisiologicamente maduras, localizadas na porção mediana da copa. Para cada planta, considerou-se o índice SPAD como resultante da média aritmética dessas três folhas. Obteve-se também a massa seca de parte aérea e raiz, cujos materiais foram acondicionados em embalagens de papel e submetidos à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, durante 72 horas, e o peso foi verificado utilizando balança de precisão de 0,001 mg.

Além disso, foram realizadas avaliações morfológicas dos isolados com base em chave de identificação, observando as características das colônias e também avaliações

fisiológicas quanto à produção de auxina, por meio da medição de absorvância com concentração de compostos indólicos estimada por meio de curva padrão, com quantidades conhecidas de ácido indolacético. A solubilização de fosfato foi verificada pelo método de plaqueamento em gota, a partir da formação do halo de solubilização, e a fixação biológica de nitrogênio de forma qualitativa *in vitro*, conforme metodologia apresentada no artigo 1.

## **2.2 Análise estatística**

Em ambos os experimentos, os dados referentes as avaliações das bactérias em promover crescimento foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Lilliefors) e homogeneidade (Teste de Batlett), conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006). Após a verificação positiva em ambos, realizou-se a análise de variância (ANAVA) e, quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Houve efeito significativo para as variáveis: diâmetro (DIA), altura (ALT), comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA), apresentando incrementos em relação à testemunha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O diâmetro foi estatisticamente superior à testemunha, quando foram inoculados os isolados MCVC02, MCVC07, MCVC11, MCVC14, MCVC15 e MCVC17 (Tabela 1). Já em relação à altura, os melhores resultados foram encontrados, quando as plantas foram inoculadas com os isolados MCVC01, MCVC02, MCVC07, MCVC11, MCVC15, MCVC17 e MCVC19, diferindo estatisticamente da testemunha e dos demais tratamentos.

**Tabela 1** – Diâmetro (DIM), altura (ALT), comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), proporção parte aérea e raiz (PA/R), índice SPAD (SPAD) e número de folhas (NUF) da variedade Catuaí IAC 144 de *Coffea arabica*, sob inoculação de isolados bacterianos.

Tratamentos	DIA (mm)	ALT -----cm-----	CPR -----gramas-----	MSR	MSPA	PA/R (%)	SPAD	NUF
Testemunha	3,2 b	22,0 b	20,9 b	0,75 b	1,9 b	39	57,6 a	12 a
MCVC01	2,8 b	25,4 a	19,1 b	1,33 a	2,2 b	60	60,4 a	12 a
MCVC02	3,6 a	24,5 a	23,3 a	1,81 a	2,9 a	62	58,7 a	15 a
MCVC03	2,8 b	23,4 b	19,8 b	0,74 b	1,2 b	62	51,5 a	12 a
MCVC05	3,2 b	22,0 b	24,0 a	1,26 a	2,2 b	57	61,4 a	15 a
MCVC07	4,4 a	26,0 a	25,3 a	1,57 a	3,8 a	41	51,9 a	14 a
MCVC09	2,7 b	22,8 b	17,9 b	1,00 a	1,9 b	53	54,8 a	12 a
MCVC11	3,6 a	26,9 a	17,0 b	1,48 a	2,5 b	59	56,3 a	14 a
MCVC13	3,0 b	22,1 b	21,7 a	1,09 a	2,1 b	52	52,4 a	15 a
MCVC14	3,5 a	22,5 b	23,7 a	1,38 a	2,0 b	69	54,6 a	14 a
MCVC15	3,5 a	24,8 a	26,0 a	1,33 a	3,3 a	40	61,6 a	15 a
MCVC17	4,0 a	28,0 a	24,3 a	1,29 a	4,3 a	30	58,2 a	14 a
MCVC19	3,3 b	27,9 a	23,9 a	1,00 a	2,8 a	36	52,8 a	15 a
Cv (%)	20,7	11,8	20,4	49,5	51,8	24	32,5	20,9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os isolados MCVC07, MCVC11 e MCVC17 foram os que se destacaram nas avaliações de altura e diâmetro, os quais foram caracterizados como produtores de auxina, fixadores de nitrogênio e capazes de solubilizar fosfato. O isolado MCVC07 foi 37,5% e 18,2% superior à testemunha nas avaliações de diâmetro e altura, respectivamente. Este isolado apresentou um incremento de 57,14% em relação ao isolado MCVC01 e MCVC03 com menores valores de diâmetro. Já o isolado MCVC17 foi 27,3% maior em relação à testemunha e ao isolado MCVC05, ambos com menores alturas.

Além disso, esses isolados tiveram menor relação PA/R, e as relações entre esses órgãos são coordenadas e reguladas por fitormônios, o que pode estar relacionado, possivelmente, pela ação da auxina produzida pelos isolados, visto que a produção de auxina favorece a expansão dos tecidos, resultando em ganhos em altura e diâmetro. Outros fatores que também podem ter favorecido a maior expressão dessas características devem-se ao fato de os isolados fixarem nitrogênio e solubilizar fosfato, o que pode proporcionar ganhos para as plantas por meio da produção de novos tecidos, ocasionados pela maior presença de moléculas de DNA e RNA; e, conseqüentemente, crescimento da planta.

Os resultados obtidos para o comprimento da raiz também foram superiores à testemunha com o uso dos isolados MCVC02, MCVC05, MCVC07, MCVC13, MCVC14, MCVC15, MCVC17 e MCVC19, o que pode estar associado também à produção de auxina, uma vez que esses isolados produzem esse hormônio que geralmente afeta a divisão, extensão e diferenciação celular, aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz e controla processos de crescimento vegetativo (Glick, 2012). O isolado MCVC15 apresentou um incremento de 24,4% de crescimento radicular em relação à testemunha.

A inoculação desses isolados, em mudas de café, resulta em plantas com sistemas radiculares mais desenvolvidos, de acordo com Caldwell *et al.* (2015), pois as bactérias promotoras de crescimento, associadas à rizosfera de plantas de café, são capazes de explorar um maior volume de solo, refletindo na melhor absorção e aproveitamento de água e nutrientes, o que pode influenciar diretamente na produtividade da planta e na tolerância ao déficit hídrico.

A massa seca de raiz (MSR) e a massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas apresentaram resultados significativos, com maiores valores para alguns isolados em relação à testemunha. Os maiores valores para a MSR foram obtidos quando houve a associação com quase todos os isolados, exceto o MCVC03, que foi estatisticamente igual à testemunha, portanto, não favoreceu uma resposta tão satisfatória para as mudas de café em detrimento aos demais isolados. Para essa característica, nota-se a expressão do isolado MCVC07 que alcançou um incremento de 109% em relação à testemunha, corroborando sua importância na promoção do crescimento em café.

Já em relação à MSPA, os maiores valores foram observados ao se utilizar os isolados MCVC02, MCVC07, MCVC15, MCVC17 e MCVC19, com incrementos que variaram de 47% a 126% para os isolados MCVC19 e MCVC17, respectivamente, cujos resultados foram superiores à testemunha.

Resultados encontrados por Pimentel *et al.* (2008) corroboram o presente estudo, nos quais os autores verificaram, com base na média geral das cultivares avaliadas (Icatu, Obatã, Oeiras, Catucaí e Catuaí), que a massa seca de folhas aumentou significativamente quando as mudas foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense*, com incremento de 5,9% na biomassa das folhas, considerando o período avaliado, que correspondeu a 270 dias estudando o desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro.

Em testes realizados em lavouras de café com a inoculação de *B. subtilis*, Muñoz *et al.* (2021) observaram maior acúmulo de massa seca em plantas inoculadas (2,37%), o

que significou um aumento de 7 vezes mais em relação à testemunha (sem inoculação). Segundo os autores, esses resultados estão correlacionados com a produção de substâncias reguladoras, como auxinas, giberelinas, citocininas ou por uma maior adsorção do nutriente em decorrência da capacidade da bactéria em solubilizar fósforo.

Em contrapartida, Ricci *et al.* (2005), estudando o crescimento de mudas de café inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpe Cd, verificaram que a cultivar Catuaí respondeu negativamente à inoculação para massa seca de parte aérea. De acordo com os autores, isso pode estar associado às altas temperaturas ocorridas no interior da casa de vegetação.

Na formação de mudas de café, é importante avaliar algumas características que indicam a qualidade dessas mudas, pois nem sempre mudas grandes e bonitas, representa boa qualidade, já que um bom sistema radicular, equilibrado, será essencial no pegamento e desenvolvimento das plantas no pós-plantio (Matiello, 2020). Uma dessas características que é pouco verificada é a proporção entre o sistema radicular e a parte aérea (PA/R). Segundo Matiello (2020), é adequado que o peso de raízes seja equivalente a cerca de 25% a 30% em relação ao peso da parte aérea, o que foi verificado em todos os tratamentos.

Em um trabalho realizado por Souza (2018), estudando diversas variedades de café, foi possível observar um aumento na proporção entre massa seca do sistema radicular e massa seca da parte aérea em todos os tratamentos em relação à mensuração inicial, sendo que os tratamentos à base de rizobactérias apresentaram os melhores resultados, proporcionando um aumento superior a 100 % na referida relação. Resultados semelhantes foram verificados no presente estudo, nos quais o maior percentual foi quando houve a inoculação da bactéria MCVC16, com proporção superior a 90%.

Os resultados obtidos para Índice SPAD e número de folhas (NUF) da variedade Catuaí IAC 144 não apresentaram diferença significativa, quando as mudas foram inoculadas com BPCV em comparação à Testemunha (Tabela 1). Embora não significativo, observa-se que o isolado MCVC15 teve um incremento de 7% em relação à testemunha para o índice SPAD.

Todos os isolados bacterianos apresentaram capacidade de produção de AIA *in vitro* e 13 isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico.

As variedades respondem diferentemente à inoculação com bactérias promotoras de crescimento, visto que os isolados encontrados para a variedade Catuaí amarelo 2SL

promoveram respostas diferentes para algumas características avaliadas, quando comparadas à variedade Catuaí vermelho IAC 144 (Tabela 2).

**Tabela 2** - Diâmetro (DIA), altura (ALT), comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR) massa seca de parte aérea (MSPA), proporção parte aérea e raiz (PA/R), índice SPAD (SPAD) e número de folhas (NUF) da variedade Catuaí 2SL de *Coffea arabica*, sob inoculação de isolados bacterianos

Tratamentos	DIA (mm)	ALT -----cm-----	CPR	MSR -----gramas-----	MSPA	PA/R (%)	SPAD	NUF
Testemunha	2,9 b	22,0 b	24,9 a	0,84 b	1,9 a	44	52,5 a	12 a
MCVC04	3,4 a	25,4 a	25,9 a	0,88 b	1,6 a	55	58,3 a	12 a
MCVC06	3,1 b	24,5 a	27,8 a	1,20 a	2,0 a	60	52,1 a	14 a
MCVC08	3,0 b	23,4 b	27,0 a	1,50 a	2,8 a	54	52,7 a	12 a
MCVC10	3,3 a	22,0 b	22,9 a	0,91 b	2,4 a	38	57,1 a	13 a
MCVC12	3,5 a	26,0 a	24,0 a	1,25 a	2,4 a	52	51,0 a	14 a
MCVC16	3,1 b	22,8 b	28,1 a	1,78 a	1,9 a	94	54,9 a	12 a
MCVC18	2,5 b	26,9 a	24,8 a	0,57 b	1,9 a	30	53,8 a	14 a
MCVC20	3,6 a	22,1 b	26,4 a	1,01 b	3,0 a	34	52,6 a	13 a
%Cv	13,7	22,5	15,4	47,4	47,4	37,2	14,5	20,6

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O diâmetro das plantas foi superior à testemunha, quando inoculadas com os isolados MCVC04, MCVC10, MCVC12 e MCVC20, com incremento máximo de 24% em relação à testemunha. Santinato *et al.* (2014) encontraram mudas de café com diâmetros superiores a 2,39 mm sem a adubação nitrogenada e as mudas apresentaram uma taxa de sobrevivência de 85% no campo, após 2 meses. Todos os isolados estudados proporcionaram valores superiores ao descrito, constatando a importância do uso dessas bactérias em café.

A altura foi influenciada significativamente, quando as plantas de café foram inoculadas com os isolados MCVC04, MCVC06, MCVC12 e MCVC18, diferindo-se da testemunha, com valores bastante inferiores. Pode-se inferir que a superioridade das mudas inoculadas em relação às não inoculadas, deve-se especialmente ao N acumulado nas folhas, por meio da capacidade de FBN, descrita por esses microrganismos.

É possível constatar diferença significativa na MSR, quando as mudas de café foram inoculadas com os isolados MCVC06, MCVC08, MCVC12 e MCVC16, proporcionando incrementos superiores a 43% em relação à testemunha, com destaque para o isolado MCVC16, com incremento superior a 111% para essa variável. Esse resultado permite inferir que as raízes das plantas inoculadas com esses tratamentos



conseguem explorar um maior volume de solo, relacionando-se a uma melhor eficiência no aproveitamento da água e dos nutrientes minerais presentes neste, conduzindo a uma maior tolerância a condições de deficiência hídrica, uma vez que as raízes atingem maiores profundidades e distâncias no solo (Silva *et al.*, 2018).

Não foi verificada diferença significativa nas variáveis CPR, MSPA, SPAD e NUF, quando as mudas foram inoculadas com as bactérias.

Não há muitos estudos sobre a interação de plantas perenes e BPCV, pesquisas realizadas por Chanway *et al.* (2000) mostram que bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* tiveram efeito positivo, tanto sobre a massa seca quanto sobre a altura de plantas de abeto. Já Freitas (1989) detectou aumentos significativos da altura e da massa seca em plântulas de cafeeiro que receberam isolados de *Pseudomonas* fluorescentes.

No presente estudo, pode-se constatar que a inoculação com os isolados encontrados nas variedades Catuaí vermelho IAC 144 e Catuaí amarelo 2SL favoreceu o crescimento das mudas de café em relação ao tratamento sem inoculação, cujos isolados são indicados para a utilização como promotores de crescimento. O efeito da inoculação nas duas variedades foi marcante para a MSR, o que pode estar diretamente relacionado à produção de hormônios de crescimento radicular, no caso as auxinas, pertencentes ao grupo do ácido indolacético.

Radwan *et al.* (2002) compararam a produção de compostos indólicos entre diferentes espécies de bactérias diazotróficas e observaram que a estirpe Cd de *Azospirillum brasilense* era a mais produtiva das cinco espécies testadas. Bashan, Holguin e De Bashan (2004) e Hungria *et al.* (2010) observaram que, na presença de concentrações ótimas de células das espécies de bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae*, ocorria um aumento significativo do comprimento radicular, área, massa seca, desenvolvimento lateral de raízes e pelos radiculares das plantas inoculadas, resultando em uma maior absorção de água e nutrientes, obtendo uma planta mais produtiva e vigorosa.

Efeitos positivos da inoculação de bactérias na fase de viveiro podem ser verificados por Melo *et al.* (2012), com efeitos significativos sobre a altura de mudas de eucalipto inoculadas com bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum seropedicae*, as quais promoveram ganhos acima de 21,25%, de maneira que não houve efeito deletério da inoculação sobre as plantas. Da mesma forma, Rasch, Bonaldo e Oliveira (2013), avaliando a inoculação de *Bacillus subtilis*, no substrato ou nas estacas para produção de

mudas de eucalipto, relatam ganhos em altura acima de 20% para o clone I144 (*Eucalyptus urophylla*) e 34,6% para o clone 1277 (*Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus grandis*).

De maneira geral, o uso de BPCV apresenta-se como uma alternativa viável para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma opção de cultivo com maiores ganhos, pois promove maior crescimento das plantas ao se diminuir o tempo de formação das mudas, reduzindo-se o custo de produção. Além disso, os custos de manutenção das mudas nos viveiros, durante meses, até o seu plantio definitivo no campo, pode ser acelerado, reduzindo, assim, os custos operacionais, além de aumentar a porcentagem de pegamento e estabelecimento das mudas no campo.

#### 4 CONCLUSÕES

O uso das BPCV apresenta-se como excelente alternativa no desenvolvimento e crescimento inicial de mudas de café.

Os isolados MCVC07, MCVC15, MCVC17 e MCVC19 favoreceram as melhores respostas para o crescimento de mudas de café para a variedade Catuaí vermelho IAC 144.

Para a variedade Catucaí amarelo 2SL, as melhores respostas foram obtidas quando as mudas de café foram inoculadas com os isolados MCVC04, MCVC06, MCVC12 e MCVC16.

#### REFERÊNCIAS

ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculant: solid and liquid formulations. **Soil Biol Biochem** v. 40, p. 2771–2779. 2008.

BANZATTO, D. A, KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.

CHANWAY, C. P.; ANAND, R.; YANG, H (2014). Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, p. 3 – 22.

CHOUDHURY, A. T.M.A.; KENNEDY, I.R.; Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biol Fertil Soils**, v. 39, p. 219–227. 2004.

CLAYTON, G.W.; RICE, W.A.; LUPWAYI, N. Z.; JOHNSTON, A.M.; LAFOND, G. P.; GRANT, C.A.; WALLEY, F. Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: crop yield and seed quality. **Can J Plant Sci** v. 84, p. 89–96, 2004.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.377-381, 1999.

FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 13, p. 31-34, 1989.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, FapUNIFESP (SciELO), v. 82, n. 0, p. 1–9, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica, Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, 2012.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. Documento.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015.

MELO, L. C.; OLIVEIRA, C. V.; MANFREDI, C. BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. Efeito de bactérias na promoção do enraizamento em clone de eucalipto. **Revista Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 15, p. 737 - 747, 2012.

OLIVEIRA, A. L. M. de et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56–77, 2014.

OLIVEIRA, M. A. d. et al. Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agronômico do milho. **Revista de Ciências Agrárias, Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal**, v. 38, p. 18 – 25, 2015.

Organização Internacional do Café, 2021. **Relatório sobre o Desenvolvimento do Café** (2021).

OSÓRIO FILHO, B. D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 14, n. 8, p. 707–718, 2014.

PEREIRA, G. V. de M. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 405–417, 2012.

PIMENTEL, M. S.; RICCI, M. S. F.; COSTA, J. R.; REIS, V. M.; SANTOS, V. L. S.; SILVA, M. S. Desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento. **R. Bras. Agrobiologia**, v.14, n.2, p.221-230, 2008.

RAASCH, L. D.; BONALDO, S. M.; DE OLIVEIRA, A. A. F. *Bacillus subtilis*: enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto em Sinop, norte de Mato Grosso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, 2013.

RADWAN, T.; EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis, Rehovot**, v. 32, p. 39-54, 2002.

RICCI, M. dos S. F. et al. Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. **Scientia Agricola**, v.62, p.138-144, 2005.

SANTINATO, F.; SILVA, R. P.; CASSIA, M.T.; SANTINATO, R. Análise quali-quantitativa da operação de colheita mecanizada de café em duas safras. **Coffee Science**, v.9, p.495-505, 2014.

SARAVANAKUMAR D, LAVANYA N, MUTHUMEENA K, RAGUCHANDER T, SAMIYAPPAN R. Fluorescent pseudomonad mixtures mediate disease resistance in rice plants against sheath rot (*Sarocladium oryzae*) disease. **Biocontrol**, v. 54, p. 273–286. 2009.

SILVEIRA, D. D.; OLIVEIRA, P.; LOPES, J. C. F.; MATTIA, V.; SIGNOR, A. Utilização de agrotóxicos e desenvolvimento rural sustentável no oeste do Paraná: alternativas, perspectivas e desafios. **Revista Fitos**, v. 14, p. 12-22, 2020.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. *In*: Herridge D (ed) Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. **ACIAR Proceedings**, p 52–66. 2002.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, Á. F.; RUARO, L.; RÖDER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fzb42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 26 – 33, 2015.

XAVIER, I. J.; HOLLOWAY, G.; LEGGETT, M. Development of rhizobial inoculant formulations. **Crop Management**, v. 3. 2003.

**ARTIGO III**

Crescimento inicial de plantas de café associado às bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada\*

---

\* **Situação:** Não submetido (em tradução).

## CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE CAFÉ ASSOCIADO ÀS BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E ADUBAÇÃO NITROGENADA

**RESUMO** - O Brasil é o maior produtor mundial de café, no entanto, depende da importação de 73% dos fertilizantes nitrogenados para manutenção da produtividade. Uma estratégia promissora seria incorporar microrganismos benéficos aos sistemas de produção que promovam o crescimento vegetal. Diante do exposto, este trabalho objetivou estudar a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal com diferentes níveis de sulfato de amônio, em duas variedades de café, Catuaí vermelho IAC 144 e Catuaí amarelo 2SL, com a finalidade de conhecer os benefícios do crescimento inicial das plantas em campo, determinando qual dose de nitrogênio e isolado bacteriano é mais eficaz em cada variedade. Foram utilizados 3 isolados bacterianos e um controle sem inoculação, e 4 níveis de sulfato de amônio 0, 25, 50 e 75 kg de N ha<sup>-1</sup>, em esquema fatorial e delineamento em blocos casualizados, para as duas variedades de café. Os experimentos foram montados em campo e foram avaliadas as características: comprimento de raiz, altura, diâmetro, massa seca de parte aérea e raiz, área foliar, índice SPAD, nitrogênio percentual, fotossíntese e transpiração. Os isolados bacterianos MCVC15 e MCVC17 promoveram crescimento das plantas de café, variedade Catuaí, na dose 0 kg de N ha<sup>-1</sup> para massa seca de raiz, comprimento de raiz e diâmetro. A mesma dose de nitrogênio promoveu crescimento em área foliar e comprimento de raiz para a variedade Catuaí, quando as plantas de café foram inoculadas com os isolados MCVC06 e MCVC16.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio; Promoção de crescimento; Bactérias diazotróficas.

**ABSTRACT-** Brazil is the world's largest producer of coffee, but it depends on the importation of 73% of nitrogen fertilizers to maintain productivity. A promising strategy to mitigate this problem would be to incorporate beneficial microorganisms into production systems that promote plant growth. In view of the above, this work aimed to study the association of plant growth-promoting bacteria with different levels of ammonium sulfate, in two coffee varieties, Catuaí Vermelho IAC 144 and Catuaí Amarelo 2SL, in order to know the benefits of the initial growth of plants in the field, determining which dose of nitrogen and bacterial isolate is most effective in each variety. Three bacterial isolates and one control without inoculation, and 4 levels of ammonium sulfate 0, 25, 50 and 75 kg of N ha<sup>-1</sup> were used, in a factorial scheme and a randomized block design, for the two coffee varieties. The experiments were set up in the field and the following characteristics were evaluated: root length, height, diameter, shoot and root dry mass, leaf area, SPAD index, percent nitrogen, photosynthesis and transpiration. The isolated bacteria MCVC15 and MCVC17 promote the growth of coffee plants, variety Catuaí, at a dose of 0 kg of N ha<sup>-1</sup> for root dry mass, root length and diameter. The same dose of coffee root was inoculated with the isolates MCVC06 and MCVC16.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation; Growth promotion; Diazotrophic bacteria.

## INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira está implantada, em sua grande maioria, em solos de baixa fertilidade natural, com predominância de reduzida disponibilidade de nutrientes. Nessas condições, a fertilidade deve ser reconstituída para o bom desenvolvimento e produtividade adequada dos cafeeiros. O uso e manejo adequados desses solos pressupõem a melhoria de sua fertilidade por meio das várias práticas que preservem e aumentem a matéria orgânica, diminuam a acidez, garantam um crescimento radicular vigoroso e mantenham os nutrientes em quantidade e proporções adequadas, visando à preservação ambiental e à sustentabilidade (Chien *et al.*, 2011; Dungait *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 2013).

Além de problemas ambientais, os fertilizantes químicos participam em mais de 20% dos custos de produção da cultura do café, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2021). Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas para a obtenção de altas produtividades, o nitrogênio (N) é o macronutriente exigido em maior quantidade pelo cafeeiro, devido as suas funções como componente estrutural de macromoléculas, enzimas, síntese de clorofilas, aminoácidos, proteínas, vitaminas, citocromos, ácidos nucleicos e hormônios (Marschner, 2012; Andrews, Raven e Lea, 2013). Além disso, devido à dinâmica do N no solo, têm sido estudadas práticas de manejo visando maximizar a sua eficiência, de modo a reduzir perdas por lixiviação e volatilização (Andrews, Raven e Lea, 2013; Demirbas *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2019).

Entre as alternativas existentes está a utilização de agentes biológicos, que consiste na utilização de inoculantes à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). As BPCV compreendem um grupo de microrganismos que podem estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos, coexistindo associativamente nas superfícies radiculares, na rizosfera e filosfera, e nos tecidos internos de diferentes espécies vegetais (Hungria *et al.*, 2010).

A presença desses microrganismos associativos benéficos nas plantas é vital, pois estabelece e acelera os processos bioquímicos; atuam na fixação biológica de nitrogênio (Hungria, 2011), solubilização de fosfato (Bolle *et al.*, 2013), produção de hormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas (Dartora *et al.*, 2013); e também como agentes de biocontrole e na indução de resistência sistêmica (Singh *et al.*, 2013; Bashan *et al.*, 2014).



A resposta da inoculação pode variar de acordo com o genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, bem como com a quantidade e qualidade das células de BPCV utilizadas como inoculante (Matsumura *et al.*, 2015). As bactérias promotoras têm sido encontradas em associação com grande número de espécies agronômicas, tendo uma vasta gama de gêneros descritos, incluindo *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (Hungria *et al.*, 2010; Videira *et al.*, 2012; Spolaor *et al.*, 2016). Estudos de inoculação de bactérias em mudas de café ainda são incipientes, entretanto, alguns autores já confirmaram o potencial da utilização desses microrganismos para a promoção de crescimento (Silva *et al.*, 2012; Sakiyama *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2005; Silva, Barbosa e Franco Junior, 2020).

A utilização desses microrganismos constitui uma importante vantagem, já que a interação eucarioto x procarioto pode suplementar ou até mesmo substituir as necessidades de nitrogênio requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor (Cunha *et al.*, 2016).

Tendo em vista os benefícios advindos do uso de BPCV, são necessárias pesquisas que busquem explorar mais a diversidade e funções desses microrganismos em plantas de café. Diante do exposto, este trabalho objetivou estudar a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal com diferentes níveis de sulfato de amônio, em duas variedades de café, com a finalidade de conhecer os benefícios do crescimento inicial das plantas em campo, determinando qual dose de nitrogênio e isolado bacteriano é mais eficaz em cada variedade.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, *campus* de Vitória da Conquista – BA, onde foram conduzidos dois experimentos independentes, um para a variedade Catuaí vermelho IAC 144 e o outro para a variedade Catuaí amarelo 2SL. As mudas de café utilizadas em ambos os experimentos possuíam 210 dias.

Os dois experimentos foram implantados no mesmo período, na área experimental da UESB, cujo solo foi classificado de acordo com a classe textural como franco argilo

arenoso. A amostra de solo apresentou como características químicas: pH: 5,6; P: 45 mg dm<sup>-3</sup>; K: 0,33 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca: 2,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg: 0,8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al: 0,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, V% 61, m% 3, na camada de 0-20 cm de profundidade.

A área utilizada nos experimentos foi previamente adubada, buscando a correção da fertilidade e atendimento às demandas nutricionais tradicionalmente estabelecidas para a cultura do café, segundo recomendações do IPEF (2005) e Sá *et al.* (2014). A aplicação do sulfato de amônio foi realizada após o plantio e inoculação da bactéria. O adubo foi aplicado em solução, com 500 ml de água para cada planta. A irrigação das mudas foi realizada conforme o Kc da cultura e a evapotranspiração de referência diária. Os dados meteorológicos foram coletados na estação meteorológica automática da UESB, localizada a 200 m de distância do experimento.

As mudas selecionadas para o plantio foram padronizadas quanto à altura, par de folhas e diâmetro do coleto. Na área utilizada nos experimentos, já foi introduzida algumas culturas agrícolas, como milho, feijão, couve-flor, brócolis, além de uma espécie florestal, a leucena.

Para a montagem do primeiro experimento com a variedade Catuaí vermelho IAC 144, foram utilizados como tratamentos 3 isolados bacterianos (MCVC07, MCVC15 e MCVC17) e um controle sem inoculação (T1), e as mudas estiveram sob a influência de 4 níveis crescentes de adubação nitrogenada: D0 – 0 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio; D1 – 25 kg ha<sup>-1</sup>; D2 – 50 kg ha<sup>-1</sup> e D3 – 75 kg ha<sup>-1</sup>, utilizando o fertilizante sulfato de amônio como fonte de N, dispostos em um arranjo fatorial 4x4, constituído por dezesseis tratamentos e quatro repetições, em blocos casualizados, totalizando 64 parcelas.

No segundo experimento com a variedade Catucaí amarelo 2SL, foram utilizados os isolados MCVC04, MCVC06 e MCVC16 e um controle sem inoculação (T2), totalizando 4 tratamentos, cujas mudas estiveram sob influência de 4 níveis crescentes de adubação nitrogenada: D0 – 0 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio; D1 – 25 kg ha<sup>-1</sup>; D2 – 50 kg ha<sup>-1</sup> e D3 – 75 kg ha<sup>-1</sup>, utilizando o fertilizante sulfato de amônio como fonte de N, dispostos em um arranjo fatorial 4x4, constituído por dezesseis tratamentos e quatro repetições, em blocos casualizados, perfazendo 64 parcelas.

Os isolados utilizados em ambos os experimentos foram selecionados no artigo 2, por apresentarem as melhores respostas na promoção de crescimento em mudas de café.

A dose de nitrogênio ideal foi recomendada em função da quantidade requerida pela cultura, idade das plantas e o tempo de duração do experimento, equivalente a 50 kg

ha<sup>-1</sup>, de acordo com as recomendações da 5ª Aproximação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Alvarez e Ribeiro, 1999).

Os isolados utilizados no primeiro e segundo experimentos são provenientes do isolamento de plantas aleatórias de plantios comerciais, com 5 anos de idade de *Coffea arabica*, variedades Catuaí vermelho IAC 144 e Catuaí amarelo 2SL, respectivamente. Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, *campus* de Vitória da Conquista (Lima, 2020).

Para o preparo do inoculante, os isolados bacterianos foram crescidos em meio *Dygs* líquido, e inoculados nas mudas, conforme os respectivos tratamentos, com 5 ml da solução bacteriana, colocados diretamente em contato com a raiz no momento do plantio das mudas no campo, sendo todos os isolados padronizados com uma população de 10<sup>9</sup> u.f.c. por ml.

Durante o período de condução do experimento, o volume total médio de precipitação foi de 60 mm e as médias das temperaturas máximas e mínimas foram 27,5 e 15,8°C, respectivamente. Os experimentos tiveram duração de 100 dias e, ao final, foram realizadas avaliações morfológicas, fisiológicas e nutricionais nas mudas de café.

As avaliações morfológicas consistiram na medição da altura das plantas e comprimento de raiz, realizadas com o auxílio de uma régua graduada em centímetros, o diâmetro do coleto mensurado na parte basal da planta, com o auxílio de um paquímetro digital. Em seguida, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes; colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C, até atingirem peso constante; pesadas em balança digital de precisão, obtendo, então, a massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). A área foliar foi mensurada por meio do medidor de área foliar com resolução de 0,1 mm<sup>2</sup>.

As avaliações fisiológicas compreenderam a mensuração de trocas gasosas, empregando-se o medidor portátil de fotossíntese, do tipo analisador de gases por radiação infravermelha (IRGA – *Infra red Gas Analyser*) LC Pro ADC, UK. Foram avaliadas também a fotossíntese líquida (A) e transpiração (E), sendo utilizada, para isso, uma folha no terço médio de cada planta. As leituras foram feitas no horário de 08h 30min às 11h 00min. Obteve-se o teor de clorofila total (Índice SPAD) por meio de um clorofilômetro, marca Opti-sciences, modelo CCM/200. A avaliação foi realizada em três folhas completamente expandidas e fisiologicamente maduras, localizadas na porção

mediana da copa, e considerou-se o índice SPAD como resultante da média aritmética das três folhas.

A avaliação nutricional foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por meio da quantificação de N % pelo método Kjeldahl, segundo metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1997).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade (teste de Batlett) dos dados, conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006). A análise de variância (ANAVA) foi realizada pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011) e, quando o teste F foi significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott a 5%.

Foi realizada a análise da Regressão para o parâmetro quantitativo, sendo testados os modelos linear e polinomial de 2º grau, levando em consideração a significância do parâmetro, o ajuste biológico dos dados e o coeficiente de determinação. A análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*) foi realizada pelo *software* Excel, por meio do suplemento XLSTAT.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Variedade Catuaí vermelho IAC 144**

Os resultados obtidos no experimento demonstram efeito significativo sobre os fatores isolados, doses e bactérias para as seguintes variáveis: área foliar (AF), massa seca de parte aérea (MSPA) e fotossíntese (A) para a variedade Catuaí IAC 144, conforme a Tabela 1.

Para o comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), SPAD, diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E) e fotossíntese (A), houve interação significativa entre os fatores bactérias e níveis de nitrogênio (Tabela 1).

**Tabela 1** - Resumo da análise de variância, em relação às avaliações comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada.

FV	GL	Quadrado médio									
		CPR	AF	SPAD	DIA	ALT	MSRAIZ	MSPA	E	A	N%
Dose (D)	3	26,07*	74081,4*	145,77 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	138,4*	0,5571 <sup>ns</sup>	37,6903*	0,3718*	4,1319*	0,2757 <sup>ns</sup>
Bactéria (B)	3	6,88 <sup>ns</sup>	174987,6*	88,08*	4,01*	29,4 <sup>ns</sup>	1,7727*	75,3841*	0,0099 <sup>ns</sup>	8,8547*	0,4759*
D X B	9	11,79*	137222,4*	42,56*	2,01*	379,0*	1,3027*	49,5073*	0,3617*	13,2061*	0,1318 <sup>ns</sup>
Bloco	3	10,59	8513,1	60,32	0,88	31,9	1,0653	0,004	0,2312	9,9755	0,3579
Erro	45	4,18	8076,8	17,48	0,51	20,3	0,2977	5,4686	0,042	1,2659	0,1669

\* = significativo; <sup>ns</sup> = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Avaliando a ação das bactérias separadamente, na ausência de adubação nitrogenada, observa-se efeitos positivos nas mudas de café sobre as variáveis AF, índice SPAD, diâmetro, MSRAIZ, MSPA, fotossíntese e N % (Tabela 2). Esses efeitos podem ser explicados com base nos mecanismos de promoção de crescimento identificados nesses isolados, os quais são produtores de auxina e responsivos à FBN.

As mudas de café, quando inoculadas com o isolado MCVC07, apresentaram valores significativamente maiores, comparado aos demais tratamentos para as características índice SPAD, MSRAIZ e MSPA, com valores médios de 53,16; 2,85 e 16,51g, respectivamente. Já para CPR, ALT e E, não houve diferenciação da ação das bactérias e da testemunha nas plantas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos.

Trat	CPR (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	SPAD	DIA (mm)	ALT (cm)	MSRAIZ (g)	MSPA (g)	E	A	N %
Testemunha	21,86A	615,09C	47,89B	6,22B	35,6A	2,1100B	11,8194C	1,1706A	5,1363B	2,86 B
MCVC15	22,80A	758,96B	48,77B	7,12A	37,0A	2,1894B	12,2025C	1,1800A	6,3650A	3,20 A
MCVC17	23,19A	822,57A	49,04B	7,17A	38,4A	2,3213B	14,3931B	1,1844A	6,5700A	3,25 A
MCVC07	23,30A	848,90A	53,16A	7,33A	38,4A	2,8494A	16,5069A	1,2269A	6,8050A	3,10 A
CV (%)	8,97	11,80	8,41	10,28	12,06	23,05	17,03	17,21	18,09	13,18

E: ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) / A: ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As avaliações de diâmetro, fotossíntese e N % demonstram a superioridade das plantas, quando inoculadas com todos os isolados bacterianos, diferindo-se estatisticamente da testemunha, com valores significativos. Esses resultados estão ligados diretamente à resposta da inoculação, com uma associação benéfica formada entre a

planta e as bactérias, favorecendo um maior acúmulo de N nas plantas, devido aos mecanismos de promoção de crescimento desses microrganismos.

De acordo com Rampim *et al.* (2020), a biofertilização com bactérias promotoras de crescimento é responsiva em diversas culturas com resultados significativos no desenvolvimento inicial de plântulas, maior área foliar, maior diâmetro, crescimento e volume radicular e teor relativo de clorofila.

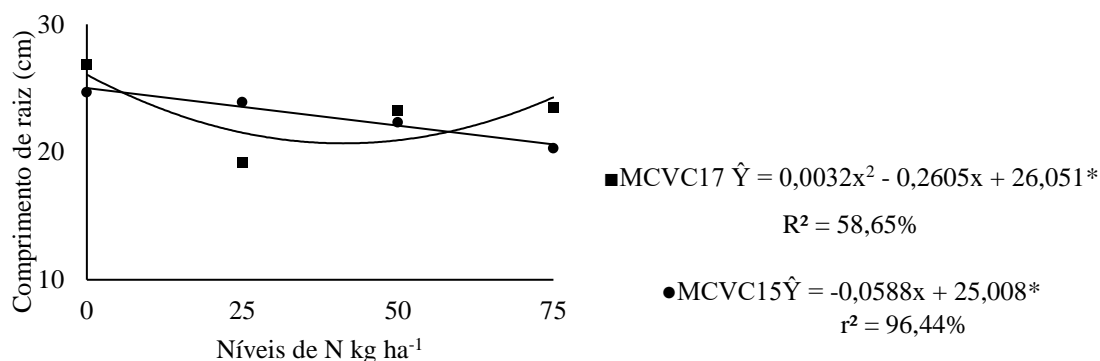
Para a variável MSPA, o isolado MCVC15 não se diferiu estatisticamente da testemunha. Já para a AF, houve diferença entre os tratamentos, com uma maior expansão foliar nas mudas inoculadas, e menores valores no tratamento controle e MCVC15, respectivamente. Tal resultado é coerente, visto que, com o maior desenvolvimento da parte aérea, verificada nos tratamentos inoculados, o processo fotossintético é mais eficiente, e, conseqüentemente, ocorre uma maior síntese de compostos fotossintetizados, o que melhora o desenvolvimento das plantas, como ocorre neste trabalho, cuja expansão da área foliar está relacionada ao ganho de massa foliar.

No desdobramento da interação entre bactérias e doses de N (Tabela 1), constatou-se que, quando a inoculação esteve associada à fertilização nitrogenada, houve significância em quase todas as variáveis em relação ao uso de cada fator isoladamente.

Na Figura 1 está demonstrado o comportamento quadrático para o isolado MCVC17 e linear decrescente para o isolado MCVC15, para a característica CPR. Consideradas as doses aplicadas, os resultados mostram um maior comprimento de raiz na ausência de N, para ambos os tratamentos, com valores iguais a 26,05 e 25,00 cm para os isolados MCVC17 e MCVC15, respectivamente. Na maior dose de N ( $75 \text{ kg ha}^{-1}$ ), observa-se comprimentos de raízes iguais a 24,51 para o primeiro isolado e 20,60 para o segundo. Essa resposta positiva dos isolados demonstra a eficiência da inoculação, pois, mesmo na ausência de nitrogênio, os tratamentos inoculados obtiveram plantas com sistemas radiculares maiores, até mesmo em relação à maior dose de N.

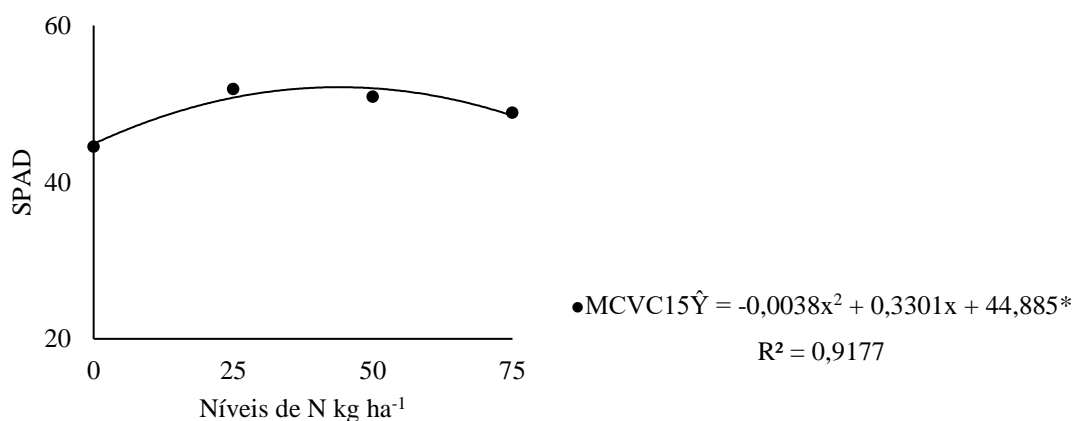
Isso acontece porque as plantas inoculadas buscam estratégias para explorar melhor o solo e, de acordo com Marschner (2012), o crescimento radicular pode ser favorecido em solos deficientes de nutrientes, notadamente de N, pois a planta tenta alocar as reservas, inicialmente, para o crescimento das raízes e, com isso, as BPCV modificam a arquitetura da raiz (Gosal *et al.*, 2012), por meio de um sistema radicular mais fino e desenvolvido que possibilita maior superfície de contato com o solo e permite captar mais água e nutrientes em longas distâncias, havendo uma maior resistência ao déficit hídrico (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Essa alteração pode ser atribuída à síntese de hormônios,

principalmente a auxina (Okumura *et al.*, 2013; Santi *et al.*, 2013), cujos isolados MCVC17 e MCVC15 produzem 63,77 e 61,88  $\mu\text{g ml}^{-1}$  desse hormônio (Lima, 2020).



**Figura 1** – Comprimento de raiz de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

O índice SPAD, que reflete os teores relativos de clorofila, apresentou comportamento quadrático dos dados; e a aplicação de nitrogênio, juntamente com a inoculação com a bactéria MCVC15, proporcionou ganhos altamente significativos com resposta máxima de 52,05, no nível de 43,43  $\text{kg de N ha}^{-1}$ . Na dose recomendada de N para a cultura do café (50  $\text{kg de N ha}^{-1}$ ), este isolado apresentou resultado correspondente a 51,89, havendo decréscimos a partir desse valor (Figura 2). A tendência dos dados para essa variável apresentou resultado esperado, pois, segundo Sant'Ana *et al.* (2010), o índice SPAD cresce linearmente com o uso da adubação nitrogenada, já que este quantifica a intensidade da cor verde das folhas que se correlaciona ao teor de nitrogênio no tecido.

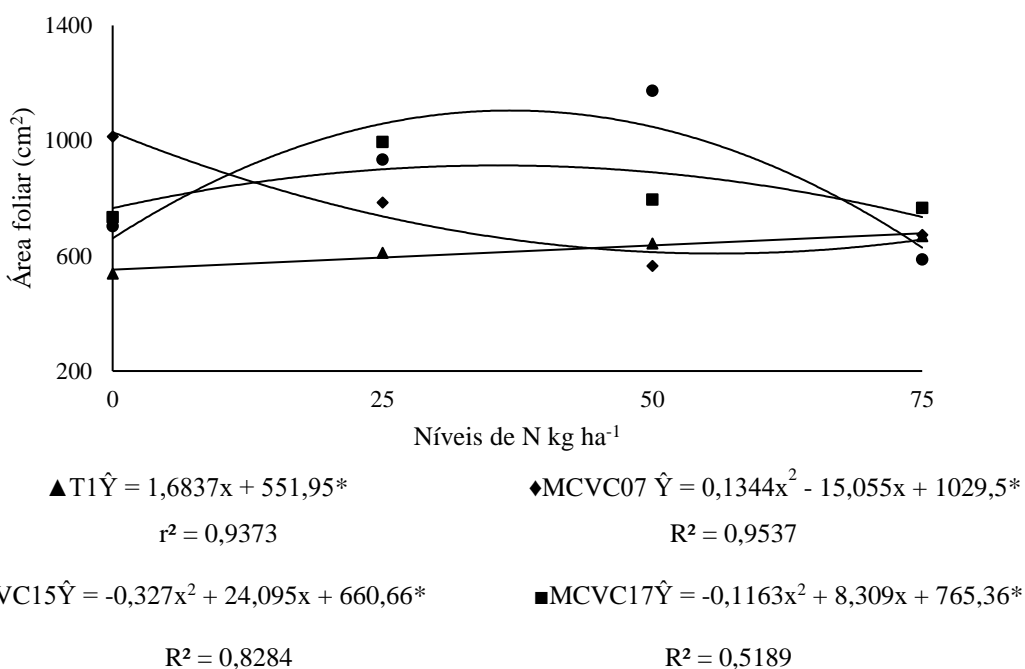


**Figura 2** – Índice SPAD de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação do isolado bacteriano MCVC15, associado a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

Para a característica área foliar, as mudas de café, quando inoculadas com os isolados MCVC15 e MCVC17, apresentaram pontos máximos equivalentes a 1104,46 e 913,76 cm<sup>2</sup>, para as doses de 36,84 e 35,72 kg de N ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3). Em comparação ao tratamento controle, houve um incremento de, aproximadamente, 80% para o isolado MCVC15 e 50% para o MCVC17.

Para o tratamento inoculado com a bactéria MCVC07 e a testemunha (T1), observa-se comportamentos diferentes. No T1, foram verificados aumentos significativos na área foliar com a adição de N. Já para o isolado MCVC07, observa-se uma maior expansão foliar (1013, 54 cm<sup>2</sup>) na ausência de N, e à medida que foi aumentando a quantidade de N, as respostas foram menores. Em comparação ao tratamento controle, houve um incremento de aproximadamente 83% na ausência de N, resultado que corrobora o de Silva (2018), no qual a inoculação de bactérias no tratamento controle 0 kg de N ha<sup>-1</sup> foi capaz de acrescentar 83,33% em área foliar, comparado à maior dose de N.

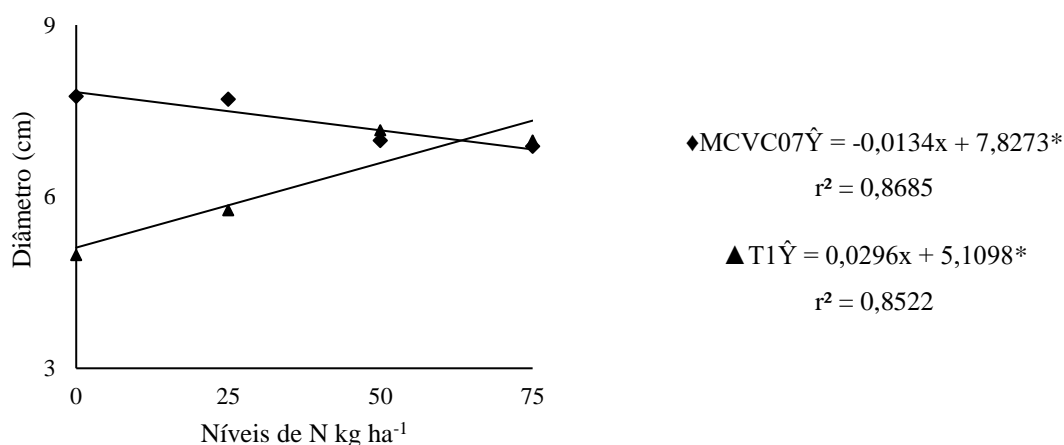
Resultados semelhantes foram encontrados por Ricci *et al.* (2005) que avaliaram o desenvolvimento de mudas de cafeeiros inoculadas com *Azospirillum brasilense*, e verificaram incremento de 29,69% em área foliar, comparado à testemunha sem inoculação.





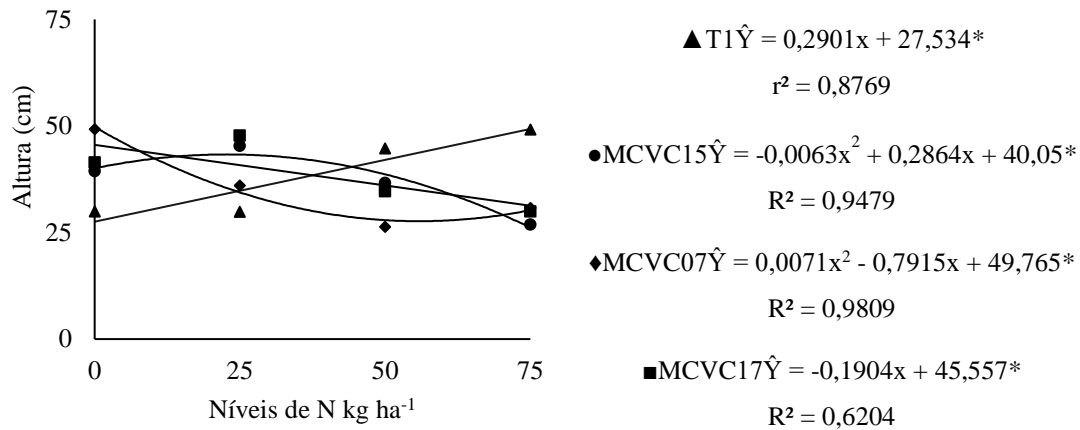
**Figura 3** – Área foliar de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07, MCVC17 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

Efeitos significativos também foram verificados para a variável diâmetro, cujos tratamentos MCVC07 e T1 foram ajustados pelos modelos lineares decrescente e crescente, respectivamente. Para o tratamento inoculado com a bactéria MCVC07, o maior valor foi obtido na ausência de N, correspondente a 7,82 cm, o que representa um incremento de 53% em relação à testemunha (Figura 4).



**Figura 4** – Diâmetro de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação do isolado bacteriano MCVC07 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

O crescimento das mudas de cafeeiros, expresso pela altura das plantas, demonstrou efeito significativo para todos os tratamentos avaliados (Figura 5). Os resultados mostram que a ausência de N foi capaz de produzir plantas com maiores alturas nos tratamentos inoculados MCVC15, MCVC07 e MCVC17, com valores equivalentes a 40,05; 49,77 e 45,56 cm, respectivamente. Em comparação ao tratamento controle (T1) sem adubação, com altura igual a 27,53, a inoculação com os isolados supracitados incrementa 45,5%; 80,8% e 65,5% na altura média das plantas. Esses resultados demonstram a eficiência da inoculação, pois mesmo na ausência de nitrogênio, os tratamentos inoculados conseguiram promover o crescimento da planta, o que pode ser associado ao suprimento de N, via fixação biológica e da síntese de hormônios (Reis Junior *et al.*, 2008), cujos isolados são responsivos a esses mecanismos.

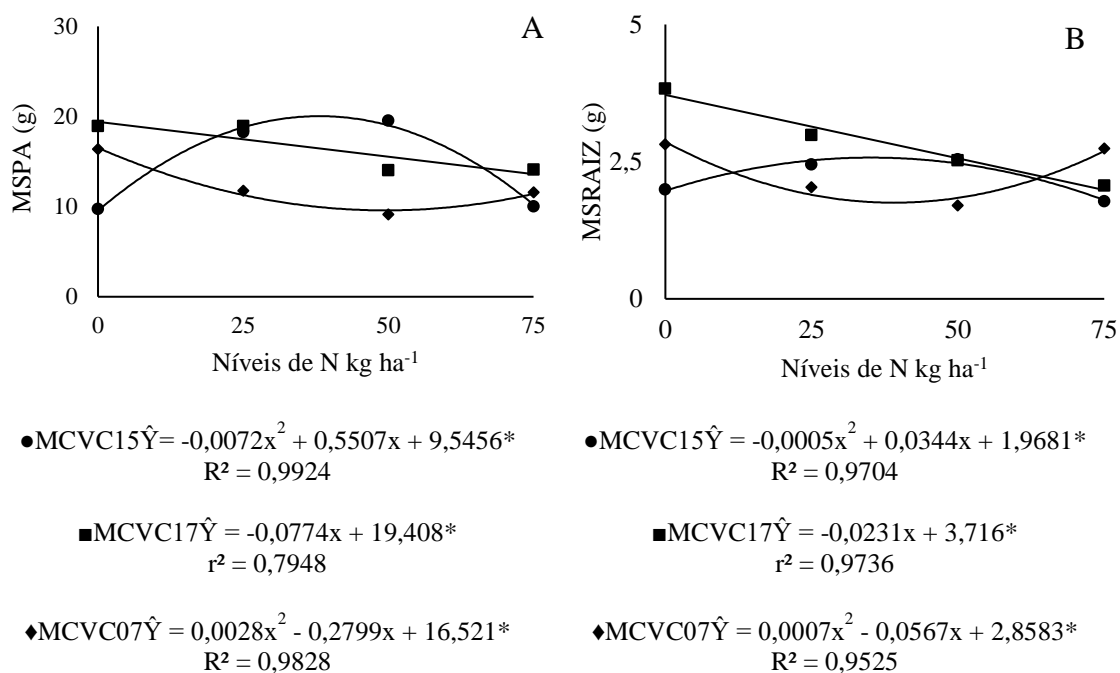


**Figura 5** – Altura de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07, MCVC17 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram verificados por Reis *et al.*, (2013), utilizando estirpes de *Azospirillum* como inoculante líquido em campo e em vaso, observaram também crescimento de parte aérea e resposta positiva para produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio em diversas culturas agrícolas.

Na Figura 6, estão apresentados os efeitos da interação dos isolados MCVC15, MCVC17 e MCVC07, e das doses de nitrogênio para as características MSPA e MSRAIZ. Observa-se comportamento quadrático crescente para a MSPA, quando se utilizou o isolado MCVC15 com ponto máximo de 20,08 g no nível de 38,24 kg de N ha<sup>-1</sup>. Já para os isolados MCVC17 e MCVC07, os maiores valores foram verificados na dose 0 kg de N ha<sup>-1</sup>, equivalentes a 19,41 e 16,52 g, respectivamente. Nota-se a superioridade do isolado MCVC17 que, mesmo na ausência de adubação, apenas com a inoculação apresentou valor próximo ao MCVC15, na presença de 38,24 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figura 6 A).

Esses resultados são corroborados com os encontrados por Pimentel *et al.* (2008), estudando o desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento, os quais verificaram que a massa seca de folhas aumentou significativamente apenas com a inoculação com a bactéria *A. brasilense*, com um incremento de 5,9% em relação ao controle sem inoculação, considerando o período avaliado, que correspondeu a 270 dias.



**Figura 6** – Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e massa seca de raiz (MSRAIZ) (B) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

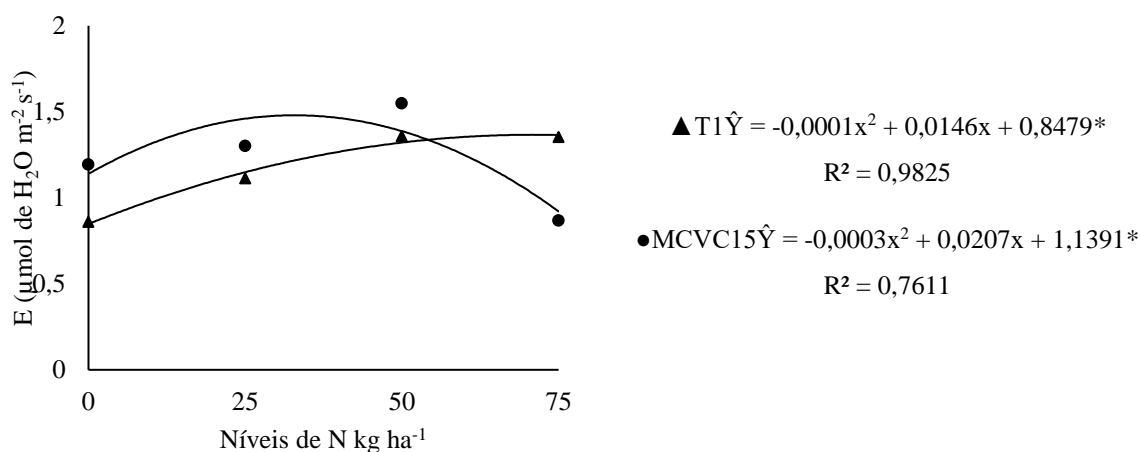
Para a MSR, verifica-se desempenho semelhante à MSPA, com comportamento quadrático, quando se utilizou o isolado MCVC15, com ponto máximo de 2,56 g no nível de 34,4 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figura 6B). Já a inoculação com os isolados MCVC07 e MCVC17, os maiores valores foram verificados na ausência de N, correspondentes a 2,86 e 3,72 g, respectivamente, constatando uma eficiente interação planta – bactéria na região da raiz. Jiménez-Salgado *et al.* (2002) utilizaram isolados de *Azospirillum* e também obtiveram ganhos na biomassa seca de raiz em mudas inoculadas de café.

Os valores referentes à transpiração se ajustaram ao modelo quadrático para a testemunha (T1) e a bactéria MCVC15. Para o T1, verifica-se que o aumento das doses de N favoreceu de forma crescente a transpiração, com ponto máximo referente a 1,38  $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na maior dose de N. Quando houve a inoculação com o isolado MCVC15, o ponto máximo para essa característica foi 1,5  $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no nível de 34,5 kg de N ha<sup>-1</sup>, ou seja, menos da metade da quantidade requerida em relação à T1 (Figura 7).

Resultados semelhantes foram descritos por Pompeu *et al.* (2010) que, estudando as características morfofisiológicas do capim-aruaana sob diferentes doses de nitrogênio,

observaram o mesmo comportamento linear crescente. Já Vasconcelos *et al.* (2021), estudando a forrageira *Panicum maximum* Brs cv. Tamani, sob doses crescentes de nitrogênio, observaram correlação linear crescente entre a aplicação do fertilizante e a transpiração, efeito este que condiz com os resultados apresentados neste estudo.

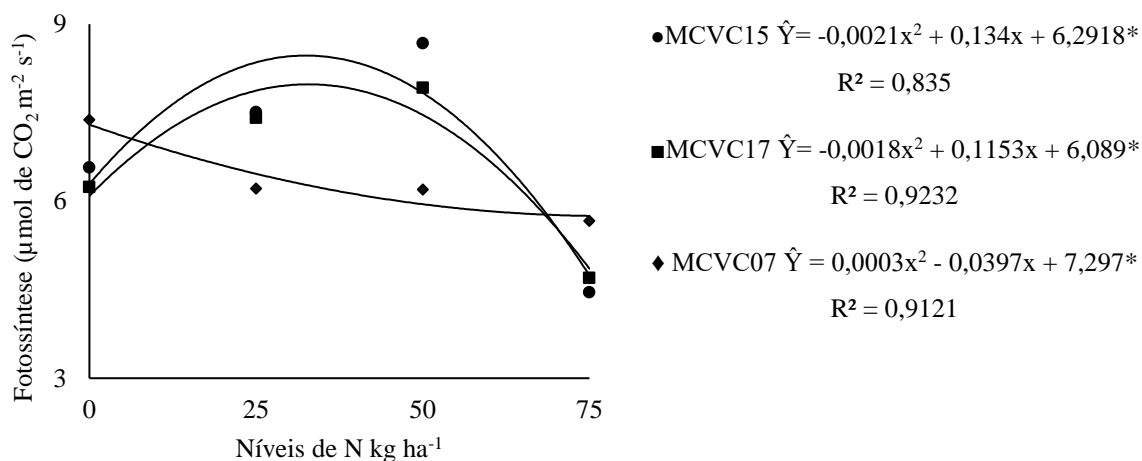
As diferenças encontradas entre os tratamentos podem estar relacionadas à necessidade de nitrogênio para funcionamento da maquinaria metabólica, principalmente no processo fotossintético, de maneira que sua eficiência, em termos da atividade das enzimas envolvidas, poderia precisar de menores ou maiores teores para alcançar um determinado rendimento, sendo um fator que contribuiria com a alocação de nutrientes (Bohórquez, 2019). No tratamento inoculado, a inoculação pode ter favorecido as plantas, o que pode estar associado ao aparato enzimático das BPCV para a realização da FBN, requerendo menores quantidades de N; o contrário ocorre no tratamento controle, cujas plantas necessitam de maiores quantidades de N para realizar as funções metabólicas.



**Figura 7** – Transpiração (E) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolado bacteriano MCVC15 e à testemunha (T1), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

A fotossíntese foi significativamente influenciada pelos tratamentos inoculados e os valores se ajustaram ao modelo quadrático. Verifica-se comportamento semelhante entre os isolados MCVC15 e MCVC17, com valores máximos de 8,43 e 7,94  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , nos níveis de 31,90 e 32,03 kg de N  $\text{ha}^{-1}$ , respectivamente. Já para o tratamento MCVC07, o maior valor foi verificado na ausência de N, correspondente a 7,28  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , resultado próximo aos valores encontrados, quando houve inoculação com os isolados MCVC15 e MCVC17 associados à adubação nitrogenada (Figura 8).

DaMatta e Rena (2002) afirmam que a eficiência fotossintética do uso do nitrogênio aumenta com diminuições dos teores de N. Machado (2015), avaliando a eficiência nutricional em 13 clones de café, verificou que, ao reduzir em 50% a disponibilidade de nitrogênio do nível recomendando, foi observado aumento da eficiência de utilização em todos os clones. Dessa forma, a inoculação associada a doses intermediárias de N favoreceu o aumento da resposta fotossintética no presente estudo.



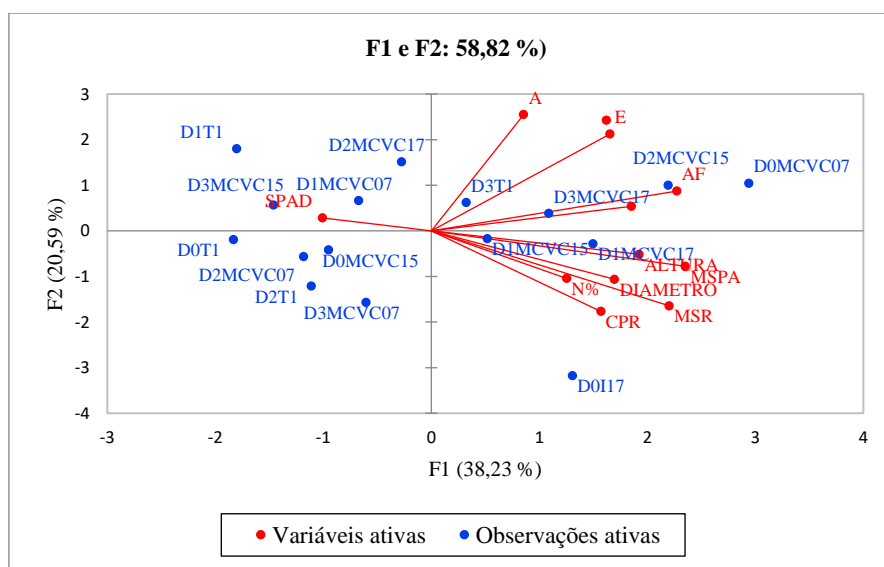
**Figura 8** – Fotossíntese (A) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catuaí IAC144, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC15, MCVC07 e MCVC17, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

Neste estudo, foi possível verificar que a adição de N-fertilizante em cobertura no solo não favoreceu melhores respostas para as características: massa seca de parte aérea e raiz, diâmetro, altura, área foliar e comprimento de raiz, quando as mudas de café foram inoculadas com os isolados bacterianos. Esses resultados podem estar associados à eficiência da fixação biológica em bactérias diazotróficas, pois, na presença de alta concentração de nitrogênio no solo, especialmente amônio, pode causar a rápida inibição da atividade da nitrogenase, responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em forma assimilável pela planta. Além do controle da atividade da nitrogenase, há evidências de que o teor de N no solo pode também regular a colonização bacteriana (Carvalho *et al.*, 2014).

Para a variedade Catuaí, a análise conjunta dos dados, por meio da análise de componentes principais, explica 58,82% da variação dos dados dentro do plano cartesiano, sendo dividida em dois fatores, o fator 1 (F1) explica 38,23% e o fator 2 (F2) explica 20,59% das interações dos fatores doses e bactérias (Figura 9).

A distribuição dos dados no plano cartesiano indica que a ação dos isolados MCVC15 e MCVC17 estão mais correlacionados com a massa seca de parte aérea (MSPA), altura, diâmetro e área foliar. Essa maior correlação se deve pela proximidade do fator 1, que explica mais a variação dos dados. Além disso, existe uma correlação negativa dessas variáveis com o Índice SPAD.

Observa-se que a maioria dessas características foi influenciada, quando os isolados se encontravam na ausência de N, mostrando o seu máximo potencial de induzir o crescimento em plantas de café.



**Figura 9** - Análise de componentes principais da distribuição das bactérias promotoras de crescimento de *Coffea arabica* variedade Catucaí IAC 144 associadas a doses de N (D0, D1, D2 e D3), em função das variáveis mensuradas: altura, diâmetro, comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA), área foliar (AF), Nitrogênio percentual (N%), fotossíntese (A) e transpiração (E).

### Variedade Catucaí amarelo 2SL

A Tabela 3 mostra que, para comprimento de raiz (CPR) e N %, não houve significância para nenhum dos fatores isolados, e nem para a interação dos fatores doses e bactérias. Já para as demais características, exceto para o diâmetro, a interação foi significativa, procedendo, assim, o desdobramento.

**Tabela 3** - Resumo da análise de variância em relação às avaliações comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de *Coffea arabica* variedade Catucaí 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos e adubação nitrogenada

FV	GL	Quadrado médio									
		CPR	AF	SPAD	DIA	ALT	MSRAIZ	MSPA	E	A	N %
Dose (D)	3	10,64 <sup>ns</sup>	90806,35*	20,54 <sup>ns</sup>	0,67 <sup>ns</sup>	252,05 <sup>ns</sup>	3,0545*	70,6660 <sup>ns</sup>	0,6225*	8,3743 <sup>ns</sup>	0,1431 <sup>ns</sup>
Bactéria (B)	3	18,54 <sup>ns</sup>	155310,00*	82,04*	3,71*	485,64*	1,2366*	110,6632*	0,3027 <sup>ns</sup>	7,4947*	0,2523 <sup>ns</sup>
D X B	9	10,45 <sup>ns</sup>	214285,53*	73,90*	0,27 <sup>ns</sup>	54,88*	1,1943*	45,8079*	0,8361*	17,7104*	0,3862 <sup>ns</sup>
Bloco	3	5,47	7595,94	103,59	2,79	60,03	0,3296	0,4966	0,2873	7,0264	0,0997
Erro	45	7,02	6113,47	17,72	1,09	17,67	0,2062	1,2863	0,1350	1,0493	0,1858

\* = significativo; <sup>ns</sup> = não significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Ao avaliar a ação da inoculação no crescimento das plantas, observa-se que, para comprimento de raiz, transpiração e N%, não houve diferenças entre os inoculantes utilizados e a testemunha sem inoculação (Tabela 4).

Avaliando as demais características, observa-se que o isolado MCVC04 foi aquele que se destacou em promover o crescimento das plantas de café em campo. Este isolado foi anteriormente caracterizado como produtor de AIA (63,78  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), sendo reconhecido também com potencial na promoção de crescimento nos experimentos iniciais de seleção em plantas de café.

**Tabela 4** – Comprimento de raiz (CPR), área foliar (AF), índice SPAD (SPAD), diâmetro (DIA), altura (ALT), massa seca de raiz (MSRAIZ), massa seca de parte aérea (MSPA), transpiração (E), fotossíntese (A) e nitrogênio percentual (N%) de *Coffea arabica* variedade Catucaí 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos

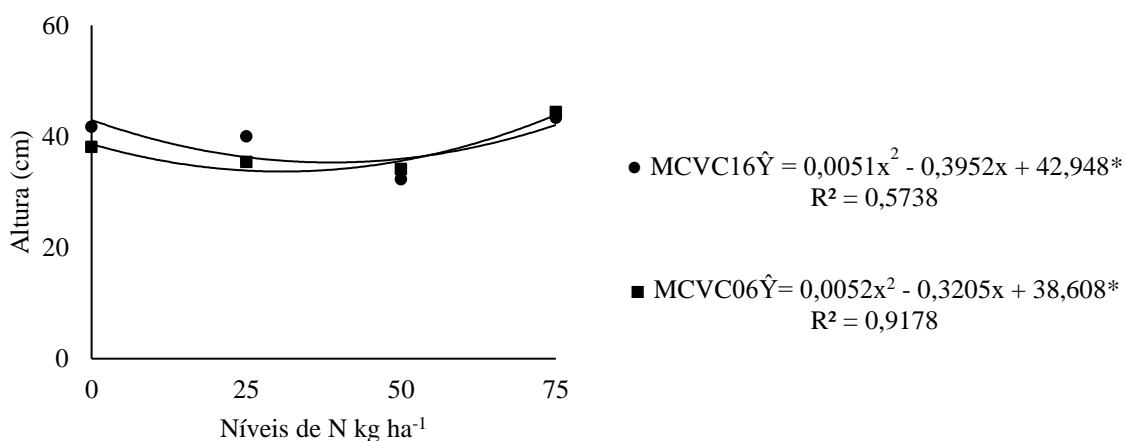
Trat	CPR (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	SPAD	DIA (mm)	ALT (cm)	MSRAIZ (g)	MSPA (g)	E	A	N %
Testemunha	21,64A	687,97C	48,31B	6,25B	29,39C	2,02B	11,32D	1,55A	6,07B	2,96A
MCVC06	23,61A	720,93C	48,44B	6,65B	37,98B	2,52A	14,29B	1,32A	7,66A	3,19A
MCVC16	21,16A	776,49B	50,80A	6,89B	39,31B	2,26B	12,89C	1,25A	6,44B	2,99A
MCVC04	22,48A	911,47A	53,09A	7,41A	42,19A	2,64A	17,50A	1,28A	6,55B	3,19A
CV (%)	11,92	10,26	8,39	15,31	11,29	19,24	8,10	27,13	18,09	13,18

E: ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) / A: ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Na Figura 10, observa-se comportamento quadrático para a altura de plantas de café, quando inoculadas com os isolados MCVC16 e MCVC06. Para o primeiro isolado, o ponto máximo foi obtido na ausência de N, com altura de 42,95 cm. Já a inoculação com o segundo isolado, as plantas de café obtiveram maiores alturas (43,82 cm) na dose de 75 kg de N ha<sup>-1</sup> e, na ausência de N, a altura foi de 38,60 cm.

Esse resultado é bastante interessante, principalmente do ponto de vista do produtor, pois mostra que a inoculação com a bactéria MCVC16, na ausência de N, apresentou valores de altura bem próximos à maior dose de nitrogênio com o isolado

MCVC06, alcançando, assim, o objetivo de minimizar os impactos dos produtos químicos no ambiente, uma vez que o uso exclusivo da bactéria já conseguiu auxiliar no crescimento das plantas. Isso acarreta em menores custos ao produtor, tendo em vista que os adubos nitrogenados são os mais caros do mercado, devido a sua alta exportação (Moreira *et al.*, 2020).



**Figura 10** – Altura de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16 e MCVC06, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

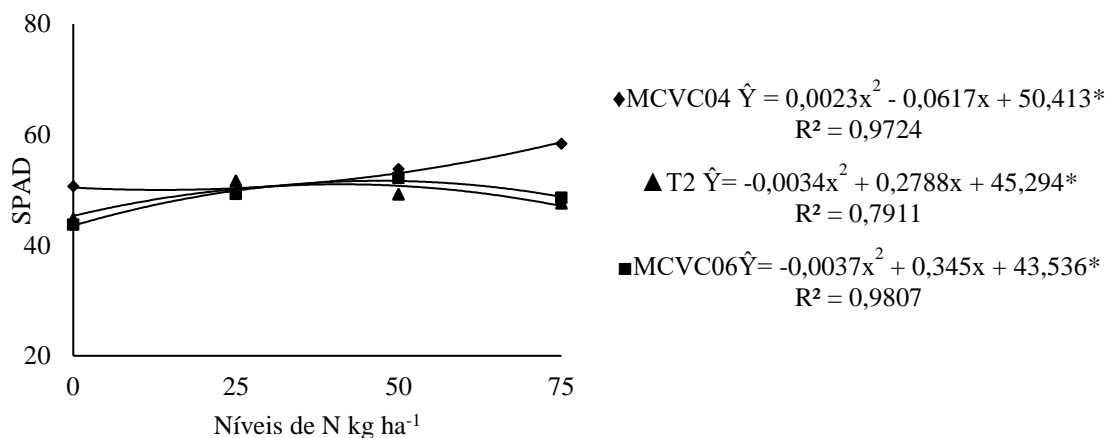
Marana *et al.* (2008) observaram que, na produção de mudas de café, quando não houve utilização de adubos de liberação lenta com 15% de N, as plantas apresentaram os menores valores de crescimento, resultado oposto ao que foi verificado no presente estudo, em que a inoculação promoveu resultados maiores ou próximos aos tratamentos com adição de N, o que evidencia a eficiência dos mecanismos de promoção de crescimento realizada pelos isolados estudados.

Para algumas culturas, como o milho, cana, arroz e trigo, estudos mostram uma contribuição das BPCP de, aproximadamente, 25 a 50 kg de N ha<sup>-1</sup> (Moreira *et al.*, 2010) para a necessidade de nitrogênio das plantas, o que indica a diminuição dos custos com adubação nitrogenada.

Para o índice SPAD, foram observadas respostas quadráticas das médias dos tratamentos MCVC04, T2 e MCVC06, nos quais a adubação nitrogenada proporcionou maiores médias nos três tratamentos, apresentando valores máximos de 58,71 com 75 kg de N; 51,00 com 41 kg de N; e 51,57 com 46,62 kg de N, respectivamente (Figura 11).

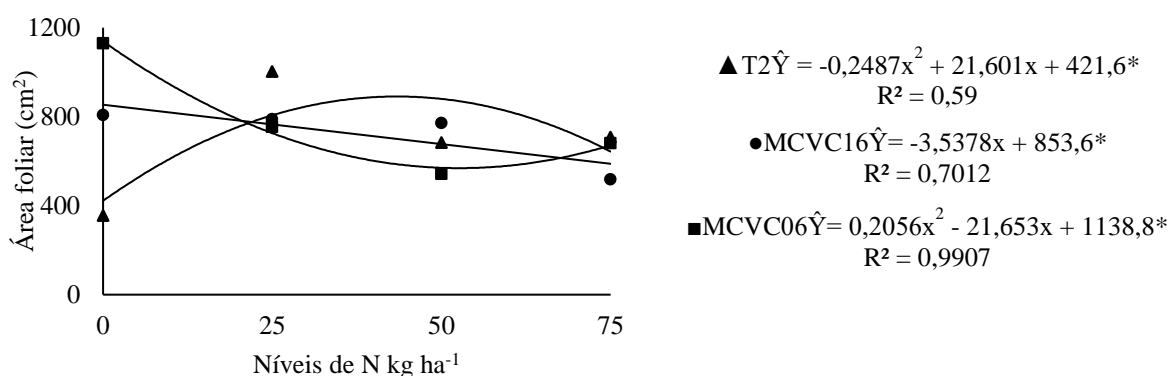


O índice SPAD infere sobre a cor verde da folha que se assemelha aos teores de clorofila no tecido; como o nitrogênio é constituinte da molécula de clorofila, é esperado que maiores níveis de N aumentem os teores de SPAD, como pode ser observado neste trabalho.



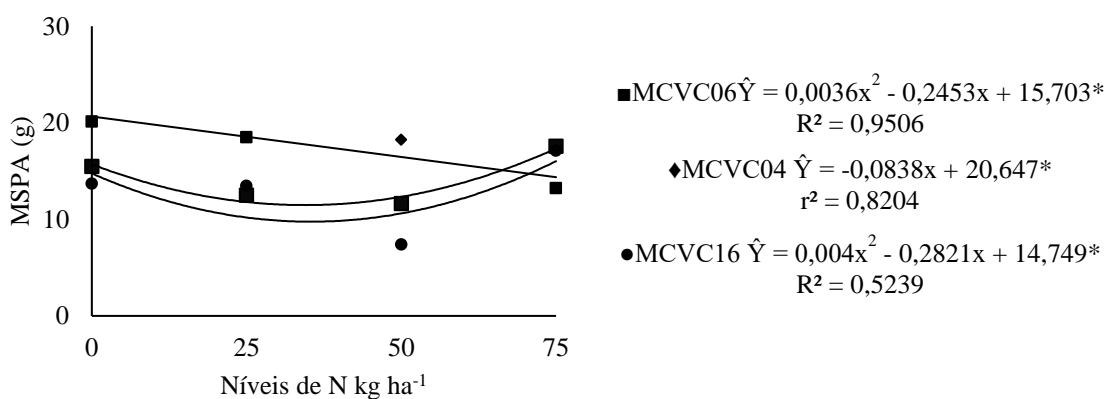
**Figura 11** - Índice SPAD de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC04, MCVC06 e à testemunha (T2), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

A área foliar das plantas de café foi totalmente influenciada pela ação dos isolados bacterianos MCVC16 e MCVC06, nos quais os valores máximos de 853,6 cm<sup>2</sup> e 1138,8 cm<sup>2</sup> foram obtidos no nível de 0 kg de N, respectivamente, ou seja, com a resposta direta da promoção de crescimento das bactérias. Considerando o tratamento controle (0 kg de N ha<sup>-1</sup>), apenas a inoculação foi capaz de acrescentar 45,10% para o isolado MCVC16 e 69,63% para o MCVC06 em área foliar específica, em relação à maior dose (75 kg N) (Figura 12). A expansão da área foliar pode ser explicada como uma resposta ao crescimento vegetal ocasionado pelas bactérias. Desse modo, incrementos em variáveis diretamente relacionadas aos componentes de produção da cultura, proporcionadas pela inoculação, são indicativos de que a produtividade também será afetada de forma positiva (Silva *et al.*, 2022).



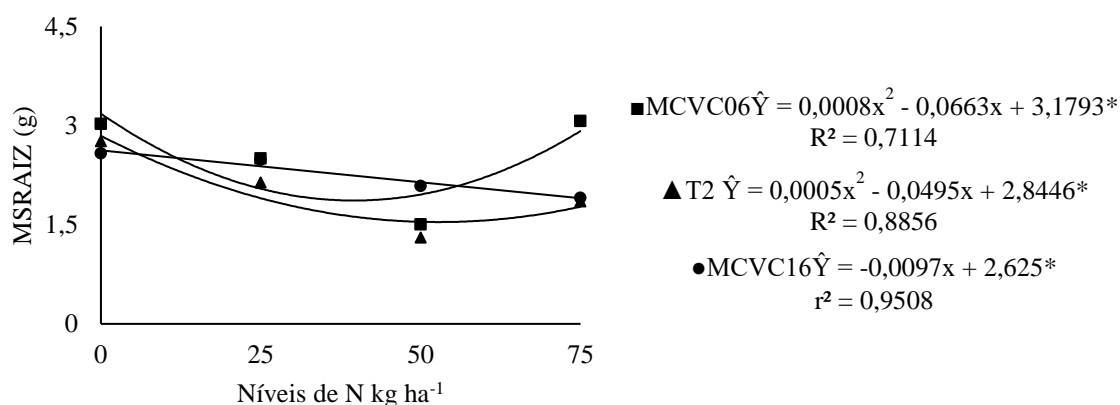
**Figura 12** - Área foliar de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16, MCVC06 e à testemunha (T2), associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

A massa seca de parte aérea foi influenciada pelos isolados MCVC16, MCVC06 e MCVC04. Nos dois primeiros isolados, o nível de 75 kg N proporcionou os valores de 16,09 g e 17,55g, respectivamente. Já no isolado MCVC04, o maior valor foi na ausência de N com 20,64g (Figura 13).



**Figura 13** - Massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC06, MCVC04 e MCVC16, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

A massa seca de raiz foi favorecida pela ação dos tratamentos MCVC06, T2 e MCVC16, na ausência de N, com valores de 3,18g; 2,8g e 2,63g. Em relação aos isolados MCVC06 e MCVC16, caracterizados como produtores de auxina (62,05 e 61,52  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), houve incrementos de 17% e 38% em relação à maior dose de N (Figura 14).

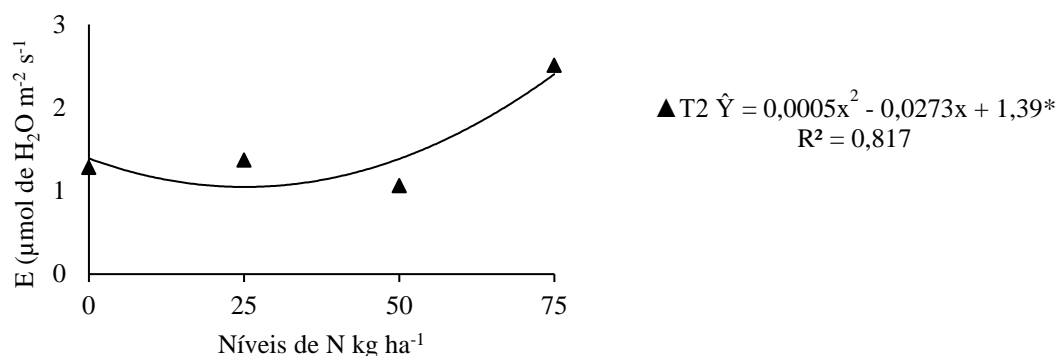


**Figura 14** - Massa seca de raiz (MSRAIZ) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCV C06, T2 e MCV C16, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

Os maiores incrementos para as variáveis morfológicas: altura, área foliar, massa seca de raiz e de parte aérea observados neste estudo, na ausência de N, podem estar relacionados à produção de auxina, realizada por essas bactérias promotoras de crescimento, segundo a quantificação feita por Lima (2020), que tem como principal função a modificação da arquitetura do sistema radicular, por meio do alongamento de pelos radiculares, favorecendo uma maior superfície de contato com o solo, o que permite captar maior quantidade de água e nutrientes, auxiliando no crescimento da planta (Gosal *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2019).

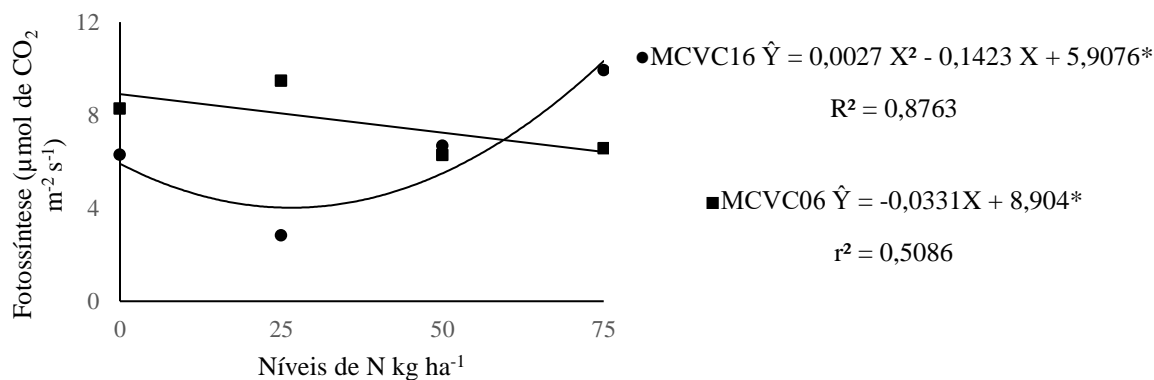
Além disso, essas bactérias também promovem a FBN *in vitro*, o que pode ter favorecido o maior crescimento das plantas, ocorrido em função da planta ter acumulado maior teor de N nas folhas, visto que o nitrogênio é o elemento que mais limita o crescimento vegetal e a sua baixa disponibilidade está associada à redução da divisão e expansão celular, da área foliar e da fotossíntese (Chanway *et al.*, 2014).

A transpiração foi significativamente influenciada somente no tratamento controle (T2). Os maiores valores para essa variável foram observados no nível de 75 kg de N ha<sup>-1</sup> cujas plantas de café apresentaram uma transpiração foliar equivalente a 2,16  $\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Essa resposta é esperada, visto que à medida que aumenta a quantidade de nitrogênio, ocorre uma maior taxa fotossintética, aumento do crescimento vegetativo das plantas, acarretando em uma maior expansão foliar (Figura 12), com isso, intensifica a transpiração (Figura 15).



**Figura 15** - Transpiração (E) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, submetido ao tratamento T2 associado a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

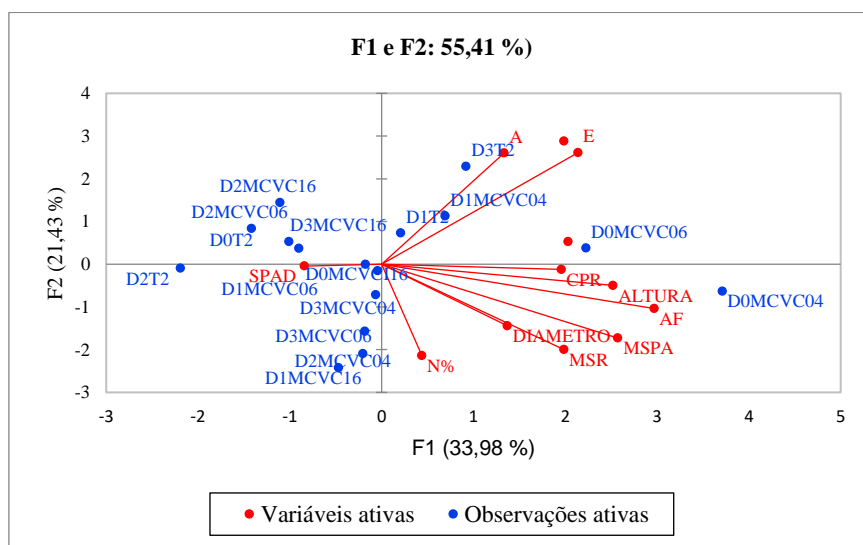
A fotossíntese foi significativamente influenciada pelos tratamentos inoculados com as bactérias MCVC16 e MCVC06, cujo ponto máximo para o primeiro isolado foi verificado na maior dose de N (75 kg ha<sup>-1</sup>), equivalente a 10,42 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; e para o segundo isolado, a ausência de N favoreceu as maiores respostas, com 8,9 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 16). Essas respostas podem estar associadas ao fato de a fotossíntese ser influenciada diretamente pela quantidade de N que é absorvida pelas plantas, já que a molécula de clorofila é constituída por N; e no tratamento inoculado com a bactéria MCVC06, a FBN pode ter favorecido no suprimento de N.



**Figura 16** – Fotossíntese (A) de plantas de *Coffea arabica* variedade Catucaí amarelo 2SL, sob inoculação de isolados bacterianos MCVC16 e MCVC06, associados a diferentes níveis de Nitrogênio. \* = significativos a 5% de probabilidade.

A análise dos componentes principais dos dados para a variedade Catucaí (Figura 17), apresentados em função da associação de bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada em café, explica 55,41% da associação dos fatores, sendo que o fator 1 (F1) explica 33,98% e o fator 2 (F2) explica 21,43% para essa variedade. Os

isolados MCVC04, MCVC06 e MCVC16 estão mais correlacionados com as variáveis área foliar (AF), altura e comprimento de raiz (CPR), na ausência de nitrogênio.



**Figura 17** - Análise de componentes principais da distribuição das bactérias promotoras de crescimento de *Coffea arabica* variedade Catucaí 2SL associadas a doses de N (D0, D1, D2 e D3), em função das variáveis mensuradas: altura, diâmetro, comprimento de raiz (CPR), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), área foliar (AF), Nitrogênio percentual (N%), fotossíntese (A) e transpiração (E).

A análise de componentes principais vem para afirmar a importância dessas bactérias promotoras de crescimento em café e a capacidade de serem independentes nessa promoção de crescimento sem a utilização de adubo sintético, ou com doses inferiores às que comumente são utilizadas.

Esses resultados sugerem que a aplicação dessas bactérias pode ter potencial para serem usadas como biofertilizantes para o cultivo de café nas condições estudadas, para as duas variedades. E o principal mecanismo de promoção de crescimento desses microrganismos foi a produção de auxina, que pode ter favorecido nas respostas morfológicas ligadas às características de área foliar, massa seca e comprimento de raiz, além disso, as bactérias também são responsivas à FBN *in vitro*, o que pode ter contribuído também para esses resultados.

## CONCLUSÕES

Os isolados das variedades de café, Catucaí IAC 144 e Catucaí 2SL, promovem respostas positivas no crescimento das plantas para as características avaliadas.

A ausência de nitrogênio favorece as melhores respostas para as características: massa seca de raiz, comprimento de raiz e diâmetro das plantas, quando inoculadas com os isolados MCVC15 e MCVC17, para a variedade Catuaí vermelho IAC 144.

Para a variedade Catuaí amarelo 2SL, a inoculação com os isolados MCVC06 e MCVC16, na ausência de adubação nitrogenada, proporciona melhores respostas para as características área foliar e comprimento de raiz.

## REFERÊNCIAS

Andrews, M.; Raven, J. A.; Lea, P. J. Do plants need nitrate ? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology** 1-26, 2013.

Bashan, Y.; BASHAN, L. E.; Prabhu, S. R.; Hernandez, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014.

Bhattacharjee, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **Journal of Botany**, 2012.

Bolle, S.; Gebremikael, M. T.; Maervoet, V.; De Neve, S. Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 705-714. 2013.

Chien, S. H.; Prochnow, L. I.; Tu, S.; Snyder, C. S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, p. 229-255, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Boletim da Safra de Café Janeiro, 2021.

DaMatta, F. M.; RENA, A. B. **Relações hídricas no cafeeiro**. 2002.

Dartora, J.; Guimarães, V. F.; Marini, D.; Sander G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, p.1023 - 1029.2013.

Demirbas, A.; Durukan, H.; Karakoy, T.; Pamiralan, H.; Gok, M.; Coskan, A. Yield and nutrient uptake improvement of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by dressing fertilization and nitrogen doses. **Agriculture for Life, Life for Agriculture Conference Proceedings**. v. 1, n. 1, p. 51-57. 2018.

Dungait, J. A.; Cardenas, L. M.; Blackwell, M. S. A.; Wu, L.; WitherS, P. J. A.; Chadwick, D. R.; Bol, R.; Murray, P. J.; Macdonald, A. J.; Whitmore, A. P.; Goulding, K. W. T. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of the Total Environment**, v. 434, p. 39-50, 2012.

Hungria, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA-SOJA, (Documentos n. 325. EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X), p. 36, 2011.

Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

Joshi, D.; Chandra, R.; Suyal, D. C.; Kumar, S.; Reeta, G. Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and soil nitrogen status. **Pedosphere**, v. 29, n. 3, p. 388- 399, 2019.

Marana, J. P.; Miglioranza, É.; Fonseca, É. D. P.; Kainuma, R. H. Índices de qualidade e crescimento de mudas de café produzidas em tubetes. **Ciência Rural**, v. 38, p. 39-45, 2008.

Marks, B. B.; Megías, M.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, p. 01-21, 2013.

Marschner, H.; Marschner, P. 2012. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London: Academic Press.

Matsumura, E. E.; Secco, V. A.; Moreira, R. S.; Dos Santos, O. J. A. P.; Hungria, M.; De Oliveira, A. L. M. Composição e atividade de comunidades bacterianas endofíticas em plantas de milho cultivadas em campo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.

Moreira, F. M. S.; Da Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; De Carvalho, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99. 2010.

Rampim, L.; Guimarães, V. F.; Salla, F. H.; da Costa, A.C.P.R.; Inagaki, A. M.; Bulegon, L. G.; de França, R. Initial development of reinoculated maize seedlings with diazotrophic bacteria. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 5, p. e24953109-e24953109, 2020.

Sant'ana, E. V. P.; Santos, A. B.; Silveira, P. M. Adubação nitrogenada na produtividade, leitura SPAD e teor de nitrogênio em folhas de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 491-496, 2010.

Singh, R. K.; Malik, N.; Singh, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience**, v. 5, p. 8-14, 2013.

Videira, S. S.; Oliveira, D. M.; Morais, R. F.; Borges, W. L.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, p. 51-66, 2012.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo exerce grande importância para a cadeia produtiva do café no Planalto da Conquista, visto que a cafeicultura brasileira está implantada, em sua grande maioria, em solos de baixa fertilidade natural e os fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, possuem custos bastante elevados para o produtor. Dessa forma, a aplicação das bactérias promotoras de crescimento pode suprir total ou parcialmente a demanda de N da cultura, podendo ser usadas como biofertilizantes para o cultivo de café nas condições estudadas.