



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Agrícola

LUNA VALENTINA ANGULO ARIAS

INOCULAÇÃO DE *Azotobacter spp.* EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*):
QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES E PRODUÇÃO DE GRÃOS

CAMPINAS

FEVEREIRO DE 2016

LUNA VALENTINA ANGULO ARIAS

INOCULAÇÃO DE *Azotobacter spp.* EM SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*):
QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES E PRODUÇÃO DE GRÃOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola, na Área de Construções Rurais e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. PAULO ADEMAR MARTINS LEAL

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-03505-2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

Ar41i Arias, Luna Valentina Angulo, 1990-
Inoculação de *Azotobacter spp.* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*)
: qualidade fisiológica das sementes e produção de grãos / Luna Valentina
Angulo Arias. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Paulo Ademar Martins Leal.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia Agrícola.

1. Agricultura. 2. Desenvolvimento. 3. Estufas. 4. Grãos. I. Leal, Paulo
Ademar Martins, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Agrícola. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inoculation of *Azotobacter spp.* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris*)
: physiological quality of seeds and grain production

Palavras-chave em inglês:

Agriculture

Development

Greenhouses

Grain

Área de concentração: Construções Rurais e Ambiente

Titulação: Mestra em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Paulo Ademar Martins Leal [Orientador]

Orivaldo Arf

Maria Angela Fagnani

Data de defesa: 23-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Luna Valentina Angulo Arias**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de fevereiro de 2016, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

Prof. Dr. Paulo Ademar Martins Leal – Presidente e Orientador
FEAGRI/UNICAMP

Prof. Dr. Orivaldo Arf – Membro Titular
UNESP/Ilha Solteira

Prof.ª Dr.ª Maria Angela Fagnani – Membro Titular
FEAGRI/UNICAMP

Faculdade de Engenharia Agrícola Unicamp

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da discente.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, parte fundamental de cada passo que dou, oferecendo-me sempre apoio incondicional, apesar de minhas decisões por vezes incomuns, e se fazendo presente nas dificuldades, para me incentivar a seguir em frente e compartilhar das alegrias, demonstrando que nenhuma distância é longa o suficiente para sentir seu imenso carinho. Em especial, dedico às mulheres da minha família, que sempre têm sido meu exemplo a seguir e o pilar de minha vida.

Dedico este trabajo a toda mi familia quienes son parte fundamental de cada paso que doy, brindándome siempre su apoyo incondicional a pesar de mis locas decisiones y siempre se hicieron presentes en las dificultades para animarme a seguir adelante y en los triunfos para compartir mis alegrías, demostrando que ninguna distancia es demasiado grande para sentir su inmenso cariño. En especial a las mujeres de mi familia que siempre han sido mi ejemplo a seguir y el pilar de mi vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer sinceramente a todas as pessoas que compartilharam comigo o caminho que me trouxe até aqui para cumprir mais um dos meus objetivos. Especialmente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Ademar Martins Leal, por sua constante orientação e apoio em todo o processo; à Rosa Helena Aguiar, por sua total colaboração e disponibilidade para desenvolver satisfatoriamente os experimentos necessários para obter os resultados do estudo; igualmente agradeço enormemente a Thais Queiroz Zorzeto, por seus conselhos, ideias e orientação com relação a este trabalho; à minha equipe de laboratório, por estar presente resolvendo as dúvidas e inconvenientes que apareceram ao longo de todo o processo e que, além de tornar mais alegres meus dias de trabalho, encheram-me de conhecimentos valiosos que não apenas me ajudaram a crescer como pessoa, mas também como pesquisadora. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de viver esta maravilhosa experiência, a minha linda família e a meus amigos, por seu apoio e acompanhamento nesta etapa da minha vida. E, finalmente, agradeço sinceramente, o apoio técnico e financeiro da FEAGRI (Faculdade de Engenharia Agrícola) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) e do FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão), cuja ajuda foi fundamental para o cumprimento do cronograma do projeto.

Obrigada a todos.

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio é um processo natural, com trabalho de micro-organismos do solo, dentre eles o *Azotobacter spp.*, que assimilam o nitrogênio atmosférico transformando-o para que as plantas o aproveitem. Esses micro-organismos podem ser adicionados nas culturas por meio da inoculação das sementes e considera-se, como hipótese, que a inoculação promova a qualidade fisiológica das sementes de feijão, sem afetar negativamente o desenvolvimento e a produção do feijoeiro. Assim, o objetivo foi verificar se a inoculação das sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com *Azotobacter spp.* interfere na germinação, emergência, vigor, desenvolvimento e a produção de grãos. As sementes foram submetidas a quatro tratamentos que se diferenciaram pela inoculação das sementes com *Azotobacter spp.*: (T1) por imersão em solução de caldo nutritivo com concentração de células viáveis maior do que 10^9 por mL do inoculante;(T2) imersão total em caldo nutritivo sem bactéria;(T3) esterilização; e (T4) sem manipulação. Avaliaram-se: índice de germinação, segundo método estabelecido pelas RAS (Regras para Análise de Sementes), número de sementes germinadas por vaso na casa de vegetação, vigor (Teste de envelhecimento), desenvolvimento das plantas (comprimento de parte aérea e radicular e massa seca da parte aérea, do sistema radicular e do total da planta) e componentes de produção (número de vagens por planta, comprimento de vagem, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos, porcentagem de nitrogênio nos grãos e produtividade de grãos). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (quatro tratamentos e quatro blocos). Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita e em casa de vegetação, da FEAGRI/UNICAMP, no período de junho a novembro de 2015. Os resultados revelaram que a inoculação das sementes não tem efeito negativo na qualidade fisiológica das sementes e estimula o incremento no índice de germinação e no vigor. Em geral, os tratamentos não afetaram o desenvolvimento e a produção do feijoeiro, sob condições de casa de vegetação.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is a natural process with the soil micro-organisms work, including the *Azotobacter spp.*, Assimilating atmospheric nitrogen transforming it for plants enjoying. These micro-organisms can be added to crops through seed inoculation and is considered as hypothesis that inoculation promotes physiological quality of bean seeds, without negatively affecting the development and production of bean. The objective was to determine whether the inoculation of bean (*Phaseolus vulgaris*) with *Azotobacter spp.* interfere with germination, emergence, vigor, development and grain production. The seeds were subjected to four treatments which differed by seed inoculation with *Azotobacter spp.* : (T1) by immersion in a nutrient broth solution with a concentration of viable cells greater than 1×10^9 per mL of the inoculant; (T2) total immersion in a nutrient broth solution without bacteria; (T3) sterilization; and (T4) without manipulation. Were evaluated: germination index, by method established by RAS (Seed Analysis Rules), number of germinated seeds per pot in the greenhouse effect, vigor (accelerated aging test), development of plants (length of shoot and root, and dry weight of the shoot, root system and the whole plant) and yield components (number of pods per plant, pod length, number of seeds per pod and weight of 100 grains, percentage of nitrogen in the grains and grain production). The experimental design was randomized blocks (four treatments and four blocks). The experiments were conducted at the Laboratory of Postharvest Technology and in a greenhouse, the FEAGRI / UNICAMP, from June to November 2015. The results revealed that seed inoculation has no negative effect on seed quality and stimulates the increase in germination rate and vigor. In general, the treatments did not affect the development and production of dry beans, under greenhouse conditions.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O feijão	16
3.2 Qualidade fisiológica das sementes de feijão	17
3.3 Desenvolvimento e produtividade do feijoeiro	18
3.3.1. Considerações agronômicas para o desenvolvimento do Feijoeiro	18
3.3.2. Produtividade	21
3.4 Adubação nitrogenada e a fixação biológica do nitrogênio	22
3.5 Azotobacter spp.	24
3.6 Tratamento de sementes	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Matéria-prima: sementes	28
4.2 Inoculante	28
4.2.1 Isolamento do micro-organismo	28
4.2.2 Preparo do inoculante	30
4.2.3 Inoculação das sementes	32
4.3 Localização e caracterização da área de trabalho	34
4.4 Qualidade fisiológica das sementes	36
4.4.1 Germinação e emergência	36
4.4.2 Vigor	38
4.5 Desenvolvimento da cultura	38
4.5.1 Preparo da área de trabalho e raleamento	38
4.5.2 Coleta de dados	39
4.6 Produtividade do feijoeiro	40
4.7 Análise de ganho de nitrogênio nos grãos	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Qualidade fisiológica das sementes	42
5.1.1 Teste de germinação e teste de emergência em casa de vegetação	42
5.1.2 Vigor	44

5.2 Desenvolvimento da cultura	45
5.3 Produtividade do feijoeiro	50
CONCLUSÕES	54
BIBLIOGRAFIA	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sementes de Feijão Carioca: IAC Alvorada.....	28
Figura 2. Identificação visual das colônias de <i>Azotobacter chroococcum</i>	30
Figura 3. Preparo do inoculante.....	31
Figura 4. Análise da concentração do <i>Azotobacter chroococcum</i>.....	32
Figura 5. Sistema de agitação para inoculação das sementes: a direita sementes inoculadas com <i>Azotobacter chroococcum</i>, a esquerda sementes em imersão no caldo nutritivo.....	33
Figura 6. Sementes tratadas.	33
Figura 7. Montagem do experimento na casa de vegetação.	35
Figura 8. Teste de germinação.	36
Figura 9. Categorias de anormalidades em dicotiledônea. Disponível nas RAS (Brasil, 2009).....	37
Figura 10. Montagem para o teste de emergência em casa de vegetação.....	38
Figura 11. Distribuição dos vasos na casa de vegetação.	39
Figura 12. Coleta de dados da produtividade.....	40
Figura 13. Determinação de proteína.	41
Figura 14. Comportamento da Emergência das sementes de Feijão Carioca em condições favoráveis de casa de vegetação, submetidas a diferentes tratamentos (T1, sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo; T2, sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria; T3, sementes esterilizadas; e T4, sementes não tratadas).....	43
Figura 15. Ganho de massa seca do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).	46
Figura 16. Ganho de massa seca na parte aérea do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).....	47
Figura 17. Ganho de massa seca na parte radicular do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).....	48

Figura 18. Alongamento na parte aérea do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).	49
Figura 19. Alongamento na parte radicular do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).....	50
Figura 20. Conteúdo de proteína nos grãos de Feijão carioca em função do tratamento. ...	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de conforto para o Feijoeiro	18
Tabela 2. Dados climáticos de Campinas para um período de 20 anos.....	19
Tabela 3. Formulação do Agar para o isolamento do <i>Azotobacter spp.</i>	29
Tabela 4. Identificação do micro-organismo (<i>Azotobacter chroococcum</i>)	30
Tabela 5. Formulação do caldo nutritivo para inoculação.....	31
Tabela 6. Resultado da análise química do solo da área experimental sem adubação prévia.	34
Tabela 7. Quantidades médias de nutrientes exportados por 1000 kg de grãos.	35
Tabela 8. Número de sementes germinadas e índice de germinação de plântulas normais e anormais, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizada) e T4 (sementes não tratadas).	43
Tabela 9. Teste de vigor: valores médios em porcentagem (%) de plântulas normais, plântulas anormais, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).	44
Tabela 10. Valores médios obtidos para as variáveis de produtividade, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).	51
Tabela 11. Correlação simples entre as variáveis de produtividade: N. VA (número de vagens), COMP (comprimento de vagens); N. GR (número de grãos por planta); MASSA (massa de 100 grãos); CONT (conteúdo de proteína).	52

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, evidenciou-se aumento do interesse por produção de alimentos segura, sem consequências negativas para o ambiente. O abuso de fertilizantes nitrogenados e químicos em geral, além de encarecer o sistema de produção, tem ocasionado grande perda de solos férteis, pois altera suas condições naturais, acidificando-os, por exemplo, o que traz consequências negativas para os micro-organismos responsáveis por manter o equilíbrio entre culturas de boa qualidade e a fertilidade dos solos. A fixação biológica de nitrogênio é um processo natural, relacionada com o trabalho de micro-organismos do solo que assimilam o nitrogênio atmosférico, simplificando-o para que a plântula o aproveite, sem apresentar consequências negativas para o solo.

O feijão é um dos alimentos mais consumidos no Brasil e, sendo um produto que faz parte da alimentação básica, é importante assegurar sua disponibilidade no mercado. As pesquisas visam desenvolver tratamentos que permitam o aumento da produtividade a baixo custo e sem afetar negativamente a produtividade, nem a qualidade fisiológica das sementes submetidas aos tratamentos. Essas pesquisas na agricultura têm sido focadas em desenvolver sementes que consigam gerar plantas resistentes a doenças, pragas e deficiências de nutrientes no solo. Segundo Lobo *et al.* (2013), sementes de qualidade referem-se a sementes de alta germinação e vigor, com alta pureza genética e física, características que são determinadas depois da aplicação de diferentes testes estabelecidos por normas rígidas da área. Essas características podem ser afetadas por tratamentos aplicados às sementes para melhorar a resistência a doenças, a eficiência de absorção de nutrientes entre outros. A inoculação com agentes biológicos ou químicos é um dos tratamentos aplicados.

Entre os agentes biológicos, os trabalhos com inoculação das plantas, com sementes ou solos com micro-organismos com capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, têm sido os mais citados nos últimos anos, já que a inoculação com esses micro-organismos facilita o aproveitamento do nitrogênio na nutrição das plantas. O feijão é um grão de alta demanda proteica, porém o custo de produção inclui altos investimentos em adubação nitrogenada. Nesse sentido, a inoculação das sementes é uma alternativa que permite baixar os custos da adubação, diminuindo a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados e os danos ao meio ambiente e aos solos.

A forma de aplicação de um inoculante depende do tipo do inoculante. Os inoculantes devem ser aplicados de maneira a recobrir homoganeamente as sementes. Os inoculantes líquidos ou géis podem ser aplicados, tanto sobre as sementes como diretamente

no sulco de semeadura. Esse tipo de formulação proporciona uma distribuição mais uniforme e apresenta capacidade de aderência mais efetiva (DENARDIN, 2010). Segundo a Embrapa Arroz e Feijão (2012), na legislação brasileira é exigida uma concentração mínima de 1×10^9 células viáveis por grama ou ml do produto. Na dose de inoculante a ser aplicada devem ser fornecidas, no mínimo, 1,2 milhões de células viáveis por semente. Além disso, o volume de inoculante líquido a aplicar não deve ser inferior a 100 mL por 50 kg de semente, sem diluição em água. No entanto, esses tratamentos podem afetar a qualidade das sementes pelo qual se faz muito importante avaliar os efeitos em pontos críticos, como a germinação, o vigor, o desenvolvimento da cultura e a produtividade.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a inoculação de *Azotobacter spp.*; micro-organismo com capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio, em sementes de feijão, afeta a qualidade fisiológica das sementes, o desenvolvimento da cultura e a produção de grãos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o desenvolvimento e a produção de grãos de feijão, associados à inoculação com *Azotobacter spp.* e conduzida em casa de vegetação.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a qualidade fisiológica das sementes de feijão quando inoculadas com *Azotobacter spp.*, com relação às variáveis de germinação, emergência e vigor.
- Verificar se a inoculação com *Azotobacter spp.* afeta o desenvolvimento e a produção de grãos de feijão.
- Analisar o ganho de nitrogênio nos grãos do feijoeiro associado à inoculação com *Azotobacter spp.*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O feijão

O gênero *Phaseolus* inclui espécies leguminosas de importância alimentar para o mundo, que são desenvolvidas numa grande variedade de condições ambientais, como por exemplo o feijão comum que teve origem mesoamericana (Lopez, 2013). Devido às facilidades de produção do feijoeiro em diferentes ambientes, essa leguminosa foi adotada pela humanidade para o exercício da agricultura há milhares de anos, com fins tanto para a nutrição animal, como humana.

O feijão comum faz parte fundamental da dieta brasileira e compõe o cardápio diário da maioria da população. Seu valor nutritivo é devido ao seu conteúdo proteico, o qual varia segundo a cultivar, mas no geral corresponde a 24%. Esse valor supera os conteúdos do milho e da batata. Também apresenta alto conteúdo calórico e de fibra, além de prover ferro, cálcio, magnésio, zinco e vitaminas. O feijão, a carne bovina e o arroz contribuem com 70% da ingestão proteica diária (Machado *et al.*, 2008).

Em contraste, é necessário assegurar uma produção contínua de alimentos de alta demanda de produção, consumo e facilidade de compra como o feijão, para atender as necessidades das famílias de baixa renda. Em anos anteriores, o feijoeiro tinha apresentado baixas produtividades médias no Brasil. Para esta questão, foram levantadas muitas razões: desde o sistema de produção, efeitos climáticos, sanidade da cultura, até problemas econômicos dos agricultores (Rosolem e Marubayashi, 1994).

Há mais de 20 anos, Rosolem e Marubayashi (1994) previram o potencial das cultivares para uma agricultura moderna e econômica, mesmo que os investimentos na cultura fossem desencorajados, e também afirmaram que a irrigação e a adubação eram fatores decisivos para mudar o quadro. Esses fatos têm se visto refletidos na atualidade, com os grandes investimentos dos produtores na adubação e nos sistemas de irrigação.

No entanto, para assegurar a produtividade do feijoeiro, planejar a adubação e estabelecer o sistema de irrigação adequado para cada cultivar, têm sido necessárias inúmeras pesquisas que avaliem variáveis da qualidade fisiológica das sementes, desenvolvimento da cultura e produtividade, submetendo as cultivares a tratamentos que variam desde a inoculação das sementes até tipos de adubação em diferentes épocas do ano.

3.2 Qualidade fisiológica das sementes de feijão

A qualidade fisiológica das sementes refere-se à capacidade das sementes de gerarem uma nova planta. Essa qualidade é avaliada com a aplicação de testes de germinação, vigor e emergência. As sementes de qualidade são muito importantes para assegurar o sucesso dos feijoeiros. O uso de sementes de qualidade reduz diversos problemas, facilita a eficiência da produtividade da cultivar e a redução de custos de produção. Sementes de qualidade traduzem-se em alta germinação e vigor, com alta pureza genética e física (Lobo *et al.*, 2013).

A semente de boa qualidade permite a formação de lavoura uniforme, maximiza o aproveitamento dos demais insumos utilizados, evita a propagação e diminui as fontes de contaminação de doenças na lavoura, reduz a disseminação de plantas nocivas e a agressividade daquelas já presentes no solo (Silva, 2003).

A avaliação do poder germinativo (definido pelo percentual de sementes germinadas) é um teste que permite verificar a capacidade e o potencial das sementes em gerarem uma nova planta perfeita e vigorosa, sob condições favoráveis (Vieira e Rava, 2000).

Alguns conceitos importantes são definidos pelas Regras para Análise das Sementes (Brasil, 2009), da seguinte forma:

- Germinação: Germinação de sementes em teste de laboratório é a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo;
- Plântulas normais: são aquelas que mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, quando desenvolvidas sob condições favoráveis.
- Plântulas anormais: são aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, mesmo crescendo em condições favoráveis.

Por outro lado, o vigor trata de um fator biológico que se evidencia ao observar atentamente indivíduos da mesma espécie, que apresentam taxas de desenvolvimento diferentes, o que leva a encaixá-los em categorias como fortes, fracos, etc. O vigor das sementes são as características que determinam a capacidade de se desenvolver quando expostas a estresses ambientais (Vieira e Carvalho, 1994). Para determinar tais características, existem diferentes testes como o de Tetrazolio, o Teste de Condutividade elétrica, testes baseados na avaliação das plântulas e o teste de envelhecimento acelerado.

3.3 Desenvolvimento e produtividade do feijoeiro

As plantas requerem condições ideais para atingirem ótimas taxas de produtividade e desenvolvimento e ditas condições estão sujeitas às respostas fisiológicas de cada cultivar a fatores como temperatura, luz, umidade relativa, entre outros. Esses fatores podem ser manipulados ou controlados em casas de vegetação, e dependem do tipo de cultivar, do desenho e do material da casa de vegetação, do grau tecnológico, além das condições climáticas e das características do substrato.

3.3.1. Considerações agronômicas para o desenvolvimento do Feijoeiro

O conforto térmico de uma cultura é determinado pelas condições edafoclimáticas, que permitem o ótimo desenvolvimento da planta. Para o caso do feijão, os valores dos fatores de conforto térmico são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de conforto para o Feijoeiro

	T ar (°C)	UR ar (%)	Rad (W m ⁻²)
Valor mínimo	12	60	150
Ótimo	21	65	250
Valor máximo	35	70	400

Fonte: adaptado de Rabelo e Oliveira (2012)

Segundo Rabelo e Oliveira (2012), a maior parte da produção é procedente de microrregiões com temperaturas do ar variando de 17°C a 25°C, faixa térmica considerada apropriada para a espécie. Quando a temperatura do ar apresenta valores acima de 35°C na afloração, o rendimento de grãos é afetado. Igualmente, temperaturas abaixo de 12°C podem gerar um decréscimo no rendimento.

Além disso, áreas que apresentem umidade relativa e temperatura do ar acima de 70% e 35°C, respectivamente, favorecem a ocorrência de várias doenças. Em regiões aptas ao cultivo, o período de semeadura deve ser determinado de modo que a floração ocorra, preferencialmente, quando a temperatura do ar apresenta valores em torno de 21°C (Rabelo e Oliveira, 2012).

De forma geral, pode-se citar que regiões que apresentem valores de radiação solar entre 150 e 250 W m⁻² podem ser consideradas como ideais para o desenvolvimento do

feijoeiro. Acima de 400 W m^{-2} , a taxa de fotossíntese é praticamente constante (Rabelo e Oliveira, 2012).

Na região central do Brasil, a semeadura concentra-se em três épocas: “das águas”, ou primeira época, “da seca”, ou segunda época e “do outono-inverno”, ou terceira época. Para o Estado de São Paulo, as três épocas correspondem a agosto-outubro, janeiro-março e abril-junho, respectivamente (Rabelo e Oliveira, 2012).

O uso da casa de vegetação para a produção vegetal traz vantagens como a possibilidade de controlar a adição de insumos, segundo o desenvolvimento fenológico da cultura, em conjunto com o controle de temperatura, umidade, ventilação, o que facilita o controle do ambiente para a análise das variáveis envolvidas no seu desenvolvimento. E segundo Castellanos (2009), este método de cultivo permite ter uma produção contínua, maior qualidade, maior rendimento por área e o aproveitamento da luz difusa dentro da casa de vegetação é bem assimilada pelas hortaliças.

Na Tabela 2, apresentam-se os dados climáticos para a cidade de Campinas, obtidos pelo Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (Cepagri), com base nas variáveis coletadas através do posto meteorológico localizado no campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com periodicidade de 5 anos, informação relevante para planejar o sistema de controle de temperatura e umidade usado na casa de vegetação.

Tabela 2. Dados climáticos de Campinas para um período de 20 anos

Mês	TBS		UR		I	RAD	Vento	
	Máx. °C	Min. °C	9 h %	15 h %			V m s ⁻¹	Dir grau
dez	29,6	19,1	75	47	6,2	739,6	4,8	213
jan	29,7	19,8	78	57	6,2	723,4	4,2	227
fev	30,0	19,9	78	54	6,7	745,3	3,8	211
mar	29,9	19,6	73	50	6,3	733,3	4,6	212
abr	28,5	17,6	72	47	---	---	---	---
mai	25,5	14,5	75	46	6,6	607,2	3,9	193
jun	24,8	12,9	75	43	6,3	595,9	3,2	224
jul	24,8	12,3	73	41	6,0	590,7	3,2	204
ago	27,2	13,8	67	36	6,5	675,6	3,7	209

Média às 15 h para os meses de verão e às 9 h para os meses de inverno. Fonte: adaptado de CEPAGRI (2015). Sendo que: TBS. Máx. média: Temperatura de bulbo seco média das máximas; TBS. Min. média: Temperatura de bulbo seco média das mínimas; UR: Umidade relativa.

Em geral, para o estabelecimento da cultura, recomendam-se de 3-4 cm de profundidade para sementeira em solos argilosos ou úmidos e de 5-6 cm para solos arenosos. O número de plantas por unidade de área é resultado da combinação de espaçamento entre fileiras de plantas e número de plantas por metro de fileira. Espaçamentos de 0,40 a 0,60 m entre fileiras e com 10 a 15 plantas por metro, em geral, proporcionam os melhores rendimentos. (Silva, 2003).

O feijoeiro pode ser cultivado tanto em várzeas quanto em terras altas, desde que em locais com solos soltos, friáveis e não sujeitos ao encharcamento (Rabelo e Oliveira, 2012).

Para a nutrição da cultura, segundo Rabelo e Oliveira (2012) os dois fatores principais para a definição da adubação do feijoeiro são a disponibilidade de nutrientes no solo (medida pela análise do solo) e as exigências de nutrientes pela planta, que dependem do nível de produtividade esperada. O nitrogênio é o elemento requerido em maior quantidade pelo feijoeiro. Embora possa fixar esse nutriente da atmosfera por meio das bactérias fixadoras de nitrogênio, a quantidade de nitrogênio fixada não é suficiente para atender as necessidades da planta. Portanto, há necessidade de complementação, que deve ser feita aplicando-se uma parte na época de sementeira e o restante até antes da floração, pois é a fase em que o feijoeiro mais necessita de nitrogênio para a formação das vagens e dos grãos.

Quanto ao fósforo, por ser um nutriente deficiente na maioria dos solos e absorvido pelo feijoeiro até quase a fase final do seu ciclo, deve receber atenção especial na adubação. O potássio é bastante disponível para as culturas em muitos solos, mas a sua complementação para o feijoeiro também é necessária (Rabelo e Oliveira, 2012).

A adequada correção da acidez do solo e adubação são essenciais para a obtenção de elevados rendimentos. Para a produção de 3 t ha⁻¹ de grãos por uma cultura de feijão comum deverão ser extraídos do solo quase 290 kg ha⁻¹ de N, 55 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 250 kg ha⁻¹ de K₂O, no pico do desenvolvimento vegetativo, aos 70 dias de ciclo. Embora as exportações pelos grãos sejam menores, também, são uma quantidade considerável de nutrientes - quase 110 kg ha⁻¹ de N, 20 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O, que precisam ser repostos ao solo para que não haja comprometimento de sua fertilidade a longo prazo. Níveis reduzidos de fertilidade são indicativos de insuficiência do programa de adubação para o suprimento das exigências das plantas ou de perdas muito elevadas. Verifica-se, então, tendência para redução dos patamares de rendimento, com prejuízos aos investimentos adotados com outras práticas: sementes melhoradas, controle de ervas daninhas, pragas e doenças, dentre outros (Rabelo e Oliveira, 2012).

O manejo e a distribuição da água, associados à evapotranspiração da cultura, são os principais fatores a levar em conta para o planejamento da irrigação. Para cada época, há uma evapotranspiração (ET) e, para fins de irrigação, devem ser utilizados valores de ET ocorridos no período entre regas. No geral são valores maiores do que a média mensal e varia segundo a época de semeadura, o estágio de desenvolvimento e as condições climáticas da localidade com uma taxa entre 3 e 7 mm/dia de ET. Em geral a aplicação da água se faz em intervalos de 5 a 10 dias, dependendo das características do solo; do estágio da cultura e da evapotranspiração. Além disso, uma uniformidade na irrigação estimula positivamente a produtividade. O excesso de água representa energia gasta desnecessariamente em seu bombeamento, e pode ser avaliado pelo coeficiente de Uniformidade de Christiansen (CUC). Dentre os métodos conhecidos para o controle da irrigação temos o tensiômetro, tanque classe A e irrigômetro (Rabelo e Oliveira, 2012).

A planta de feijão é mais susceptível à competição exercida por plantas infestantes no primeiro terço de seu desenvolvimento, é hospedeira de diversas doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides e a importância de cada doença varia segundo o ano, a época, o local e a cultivar utilizada (Rabelo e Oliveira, 2012).

Também podem-se ter sérios danos dependendo da espécie da praga, da fase de desenvolvimento da cultura, da cultivar utilizada e da época de semeadura do feijão. Dentre as pragas encontradas nas lavouras de feijoeiro-comum no Brasil, as responsáveis pelas maiores perdas na produção são a cigarrinha verde, as vaquinhas, a mosca branca, os ácaros e os percevejos. Regionalmente, larva minadora, lesmas, larvas de crisomelídeos e tripes estão se destacando como pragas importantes. Depois que os insetos ou a doença estejam no ambiente, é bem difícil combatê-los; portanto, o manejo integrado de pragas, plantas daninhas e doenças, é vital para evitar a perda da produção (Rabelo e Oliveira, 2012).

3.3.2. Produtividade

A produtividade do feijoeiro está diretamente ligada aos adequados tratamentos de semeadura, irrigação, adubação e colheita que são aplicados à cultura. Por isso, a importância de se conhecer os aspectos agronômicos do desenvolvimento da cultura, que definem as condições adequadas de semeadura, as necessidades hídricas e as demandas nutricionais, entre outras, sendo essas condições que permitem estimar ou atingir uma produtividade determinada.

A cultura do feijão tipo carioca ocupa 53% da área cultivada em todo o Brasil. No segmento do agronegócio, há uma concorrência entre as cadeias produtivas; e a

competitividade de uma determinada cadeia é definida por vários fatores, como eficiência agrônômica, qualidade do produto e informação, entre outros. No caso de haver assimetria de informação sobre a quantidade e a qualidade do produto que será ofertado pelas regiões produtoras, podem surgir oportunidades ou ações que beneficiem certos segmentos mais bem informados da cadeia produtiva. No caso do feijão, esse fato torna-se mais relevante, devido à dinâmica de produção e comercialização ser complexa e praticamente desconhecida, sendo esse um dos pontos de estrangulamento do agronegócio do feijão, exacerbado por frequentes ocorrências de falhas nas previsões de mercado desse produto (Ferreira *et al.*, 2002).

Num estudo realizado por Richetti *et al.* (2011), estimou-se o custo de produção de feijão, com baixo uso de insumos, composto em: 41% pelos insumos (sementes de feijão, tratamento de sementes, fertilizante, herbicidas, inseticidas, fungicidas, adjuvante), 25% pelas operações agrícolas (gradagens, semeadura, aplicação de defensivos, colheita), 25% pela remuneração dos fatores (custos de oportunidade da terra, do capital, do custeio), 6% pela depreciação do capital e 2% por outros custos (administração, assistência técnica). Segundo Silva (2003), o custo das sementes corresponde normalmente de 10 a 20% do custo total da lavoura e o gasto de semente varia numa faixa de 45 a 120 kg por hectare.

3.4 Adubação nitrogenada e a fixação biológica do nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) representa uma grande economia em adubação, sendo os adubos nitrogenados substituídos pela inoculação das sementes, método alternativo de custo menor do que a adubação química (Ferreira, 1998). A manipulação de micro-organismos tem sido integrada devido à necessidade de métodos agroecológicos que estimulem a produção de alimentos de alto valor nutricional, sem prejuízos ao solo e ao ambiente ou riscos ao consumo humano.

Segundo Denardin (2010), uma das razões da competitividade da soja brasileira no mercado internacional está fundamentada na independência do uso de fertilizantes nitrogenados, tecnologia que, associada a outros aspectos de manejo, destaca o país como referência mundial na produção dessa oleaginosa. Contudo, independente da cultura, a adoção de certas tecnologias é primordial quando se pretende estabelecer uma agricultura com competitividade. Entre todas as questões sobre componentes de natureza climática, aptidão agrícola das terras, fertilidade do solo, época de semeadura com especificidade para cada cultivar, lavoura, qualidade fisiológica e fitossanitária da semente, nos últimos tempos, o tratamento de sementes vem incorporando um expressivo complexo de tecnologias de

natureza fisiológica, fitossanitária, nutricional e mecânica, o que torna essa atividade um componente de produção com importância econômica decisiva.

O nitrogênio é o elemento mais limitante para o desenvolvimento das plantas em solos tropicais, e o uso de produtos de sínteses tem sido incrementado na tentativa de aumentar a produção agrícola. Marin *et al.* (2003) citaram que são aplicadas, no mundo, 77 milhões de toneladas de nitrogênio como fertilizante em diversos cultivos de importância agrônômica, como hortaliças, cana, sorgo, milho, arroz, flores e ornamentais, entre outros. Isso tem provocado efeitos negativos nos recursos naturais, como acúmulo de nitratos (NO_3) no lençol freático, toxicidade nas plantas pelo alto nível de nitritos (NO_2) nos solos, contribuindo com a morte da biota e causando desequilíbrios nos processos naturais biogeoquímicos que se traduz num alto custo econômico, social e ecológico (Marin *et al.*, 2003; Jimenez, 2007).

Fritz Haber (1913) descobriu um processo para a síntese do amoníaco por combinação direta de nitrogênio e hidrogênio, adotado posteriormente por Carl Bosch (1930). O atual processo de produção de fertilizantes nitrogenados é conhecido como Haber-Bosch, que requer grandes quantidades de energia e representa apenas 50% de absorção pela planta (Andrade *et al.*, 2009).

Outro método para obtenção de nitrogênio por parte da planta é a fixação biológica do nitrogênio, processo possível pela ação de micro-organismos presentes no ambiente, conhecidos como diazotróficos, que podem ser achados em simbioses ou em vida livre. Com exceção das bactérias fotossintéticas e cianobactérias, que fixam nitrogênio, a maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas e requerem ecossistemas capazes de promover uma fonte de carbono utilizável, necessária para a fixação de nitrogênio (Marin *et al.*, 2003).

A absorção de nitrogênio ocorre praticamente durante todo o ciclo da cultura, mas a época de maior exigência, quando a velocidade de absorção é máxima, ocorre dos 35 aos 50 dias da semeadura, coincidindo com a época de florescimento (Rosolem e Marubayashi, 1994).

Em leguminosas a FBN na soja tem sido a mais relevante podendo ser estimado que quase 2 bilhões de dólares têm sido economizados anualmente com esse processo no Brasil. Isso devido principalmente ao melhoramento vegetal para uma maior contribuição de FBN e de diversos trabalhos de seleção de rizóbios para às condições dos solos brasileiros. Para o caso do feijão, foram isoladas estirpes que são tolerantes à acidez e a altas

temperaturas, podendo a inoculação com essas estirpes duplicar a média da produtividade nacional. Entretanto, nem sempre as respostas à inoculação são positivas (Marin *et al.*, 2003).

Ferreira (1998) considerou que como a duração da cultura é consequência do período ativo de fixação e pode influenciar no conteúdo total de nitrogênio, teoricamente, plantas que comecem a fixá-lo mais cedo e mantenham um período de fixação ativo mais longo se beneficiarão com maior quantidade deste elemento incorporado às vagens. Uma estratégia para melhorar a fixação de nitrogênio pelo feijoeiro seria, portanto, a extensão do período de atividade fixadora, buscando-se combinações de planta e bactéria capazes de promover uma nodulação efetiva precoce e de manter os nódulos em atividade por mais tempo.

Torres *et al.* (2002) afirmaram que a aplicação de fertilizantes biológicos é favorável para a economia e eliminam os efeitos nocivos da fertilização nitrogenada na absorção, assimilação e disponibilidade de diferentes nutrientes como o fósforo, a erradicação da contaminação atmosférica e das águas subterrâneas e do manto freático, sendo reduzido o impacto na ambiência e na economia.

3.5 *Azotobacter* spp.

Segundo Benson (2001) os micro-organismo fixadores de nitrogênio de maior impacto são pertencentes as famílias Azotobacteracea e Rhizobiacea.

A família Azotobacteracea é representada por dois gêneros, *Azotobacter* e *Azomonas*, são aeróbicos, heterotróficos e fixadores de nitrogênio. O gênero *Azotobacter* tem demonstrado desempenho de absorção ao nível da rizosfera superior a outros micro-organismos testados para a produção de adubos (Döbereiner *et al.*, (1995), citado por Marin *et al.*, 2003).

Döbereiner (1966) afirmou que a especificidade entre micro-organismos do gênero *Azotobacter* e a rizosfera de certa planta, é mais íntima do que as relações com outros micro-organismos diazotrofos de vida livre.

Benson (2001) afirma que o gênero *Azotobacter* é um dos mais benéficos e se desenvolvem melhor em solos aerados e que *Azotobacter chroococcum* faz parte desse gênero, tendo um tamanho entre 1,5 e 2 micrometros, pode ter formato de haste ou cocos e pode-se apresentar isoladamente, em pares ou grumos irregulares.

Pesquisas científicas da Universidade Javeriana de Bogotá mostraram como foram feitos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio para uso em um adubo, no regime do

programa de agricultura orgânica. O isolamento foi a partir do solo de uma cultura. As bactérias encontradas foram de vários gêneros, com a capacidade da fixação de nitrogênio. Entre os mais eficazes foram a *Azotobacter*, *Rhizobium* e *Azospirillum brasilense*. Os mesmos foram avaliados através de uma cinética de crescimento e volume de cada estirpe para validar a que tinha a maior velocidade (Jimenez, 2007).

3.6 Tratamento de sementes

Para Fernandes (2010), o tratamento de sementes é uma ferramenta fundamental para a da agricultura mundial, devido ao fato de proteger desde a germinação até a fase inicial de desenvolvimento. Segundo o autor, a falta dessa proteção inicial pode-se gerar impacto direto na produtividade. Então, para assegurar a qualidade fisiológica das sementes, bem como os possíveis efeitos positivos ou negativos que o tratamento das sementes possa acarretar, torna-se necessário o estudo aprofundado desses elementos. Esses estudos permitem identificar possíveis efeitos colaterais sobre as sementes e as plântulas e, imediatamente, buscar alternativas para minimizá-los, assim como verificar os inúmeros benefícios que os mesmos podem trazer.

Para Menten e Moraes (2010) o tratamento de sementes, além de controlar os patógenos associados às sementes, também deve controlar os habitantes invasores do solo, fungos de armazenamento e patógenos foliares iniciais. O tratamento das sementes pode assegurar estande adequado, plantas vigorosas, atraso no início de epidemias e aumento do rendimento, apresentando benefícios imediatos (custo do processo é menor que o ganho em rendimento) e a médio/longo prazo (sistema de produção equilibrado) (Menten e Moraes, 2010).

Outra questão importante refere-se às diferentes formas de aplicação dos micro-organismos no solo ou nas sementes.

É importante ter em vista que no solo existem diversos fatores que afetam a eficiência do método de inoculação de sementes, já que existem muitos micro-organismos, em sua maioria, de vida simbiótica que competem por estabelecerem-se nas raízes da planta, e nem todos estes micro-organismos têm a mesma capacidade de fixação de N (Ferreira, 1998).

Um dos desafios desta pesquisa é demonstrar como diferentes processos integrados de produção e tecnologia, associados à ambiência, podem favorecer o desenvolvimento normal do feijoeiro sem a utilização de adubos químicos, que, além impactarem negativamente no ambiente, também aumenta os custos.

A inoculação de sementes com micro-organismos é a alternativa proposta pelo presente estudo para a fixação biológica do nitrogênio, já que os processos biotecnológicos têm demonstrado que são muito efetivos, mas ainda não têm a confiança absoluta do mercado, devido à dúvida de como realizar os processos de aplicação e dos custos destes métodos e à disponibilidade desses produtos. Segundo Zago *et al.* (2000) os primeiros micro-organismos usados para a inoculação foram os rizóbios, que são os principais simbioses com leguminosas na rizosfera e responsáveis pela nodulação que facilita a fixação biológica do nitrogênio.

Segundo Agrodiagnostic (2006), os inoculantes são uma solução de bactérias em suspensão e alta concentração de importância para o mercado agrícola, obtidas pela fermentação de cepas rigorosamente selecionadas. Além disso, Agrodiagnostic, afirma que inoculantes preparados a partir de *Azotobacter spp.* tem vantagens como a facilidade de aplicação e a regeneração do solo com que se associa, isso graças a capacidade do micro-organismo a viver e se reproduzir no solo durante muitos anos.

Quanto aos sistemas de produção agrícola, Kuss (2006) afirmou que o sucesso na utilização de bactérias diazotróficas está relacionado à habilidade de selecionar, incorporar e manter populações benéficas no campo. A rotação de culturas e a forma de manejo da lavoura podem influenciar as populações microbianas do solo.

De acordo com Hungria *et al.* (1997) citado por Ferreira (1998), a inoculação do feijoeiro é muitas vezes limitada devido às características intrínsecas da planta, como a baixa capacidade de FBN de algumas cultivares e a alta susceptibilidade a estresses ambientais das estirpes de rizóbios, resultando na baixa eficiência no processo de FBN e na capacidade competitiva por sítios de infecção nodular. Como resultado, a avaliação das taxas de FBN em experimentos conduzidos com seis leguminosas em diversos países mostrou que o feijoeiro apresentava a menor porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN, isto pode estar associado a baixa eficiência da simbiose em combinação a cultivar de feijão e as condições edafoclimáticas das unidades experimentais e além disso, não teve efeitos relevantes quando comparados diferentes tipos de inoculantes em líquido ou em pó (Ferreira, 1998).

Em um estudo sobre incrementos na fixação de nitrogênio na cultura de feijão, como resultados globais obtidos do comportamento dos tratamentos frente aos parâmetros de fixação, pôde-se verificar como a inoculação combinada com *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, na razão de 150 g kg^{-1} de semente e *Azotobacter chroococcum*, foi o tratamento com os melhores valores estatísticos, justificado pela compatibilidade entre as cepas de bactérias tratadas, o sinergismo entre estas e a adequada proporção de diazotróficos

na rizosfera das plantas, ocasionando uma colonização precoce do radical por *Rhizobium*, facilitado pela excreção de substâncias estimuladoras do crescimento vegetal produzidas por *Azotobacter* influenciando diretamente a estimulação do sistema radical da planta, e criando condições favoráveis para a infecção por *Rhizobium* e o incremento na nodulação. Todos os fatores em conjunto incrementaram a disponibilidade dos nutrientes para os diazotróficos e os macro-organismos simbiotes, e, portanto, as relações associativas favoráveis para o incremento da fixação de N₂ (Torres *et al.*, 2002).

Segundo Denardin (2010), o sucesso da tecnologia da fixação biológica de nitrogênio atmosférico está associado ao adequado estabelecimento da simbiose entre planta e bactéria, ação resultante de, dentre outros fatores, inoculantes de elevada qualidade e contato íntimo e seguro com a semente. A maximização do suprimento de nitrogênio à cultura como, soja e feijoeiro, depende da qualidade do inoculante empregado e da adoção de medidas que viabilizem a interação eficiente entre planta e bactéria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido na Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI), da UNICAMP, em Campinas - SP (latitude 22° 49' 06" S, longitude 47° 03' 40" O, altitude de 635 m acima do nível do mar), sendo dividido em etapas realizadas no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita e em casa de vegetação, no campo experimental.

4.1 Matéria-prima: sementes

Foram usadas sementes de feijão do grupo carioca da cultivar IAC Alvorada (Figura 1), que apresenta potencial produtivo de 4.351 kg ha⁻¹, porte semiereto, alta qualidade de grãos, peso de mil sementes de 300 g e resistência moderada à antracnose. É recomendada para semeadura no Estado de São Paulo, nas três épocas de cultivo (das águas, da seca e de inverno), com recomendação de espaçamento entrelinhas de 50 cm e de 10 a 12 plantas por metro linear, totalizando de 200 a 240 mil plantas por hectare. O rótulo do pacote de 10 kg de sementes garante uma pureza física de 99,9%, índice de germinação variável entre 60 e 74 %.



Figura 1. Sementes de Feijão Carioca: IAC Alvorada.

4.2 Inoculante

4.2.1 Isolamento do micro-organismo

Para isolar *Azotobacter spp.*, coletaram-se pequenas quantidades de solo da área experimental da FEAGRI, numa zona delimitada de 2x2 m, em 5 diferentes pontos. As

características químicas desse solo são apresentadas na Tabela 6. A amostra do solo foi peneirada e homogeneizada em peneira de abertura 0,30 mm e, com ela, preparada uma solução com 50 g de solo e 50 mL de água destilada. Esses processos foram necessários para facilitar a separação do micro-organismo da amostra do solo.

A fase seguinte foi centrifugar a solução resultante durante 20 min com aceleração de 60 s e uma velocidade de 6000 rpm, com refrigeração (15°C), considerando as indicações de Angurell *et al.* (2014). Desse processo, resultaram duas fases: uma sólida e outra líquida. Esta última, também chamada de sobrenadante, foi usada para preparar três diluições em tubos de ensaio, na base 10, nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , procedendo como descrito segundo *Pour Plate Method* (Benson, 2001). A formulação do Agar usado para o isolamento do micro-organismo está descrita na Tabela 3. No total, foram incubadas três placas petri por concentração, a 28°C, durante 7 dias.

Tabela 3. Formulação do Agar para o isolamento do *Azotobacter spp.*

Reagente/produto	Quantidade por Litro	Observações
Manitol	20 g	pH final a 25°C de 7,4±0,2
Dipotássio de fosfato	0,2 g	
Sulfato de Magnésio	0,2 g	
Cloreto de sódio	0,2 g	
Sulfato de potássio	0,1 g	
Carbonato de cálcio	5 g	
Agar	15 g	
Água destilada	1 L	

Após os sete dias, foi observada pigmentação marrom a marrom-preta, indicando a presença do *Azotobacter chroococcum* em colônias mucosas opacas, como amostrado na Figura 2, sendo que também foram visíveis outras colônias de micro-organismos que estão alojados no solo. As colônias dentro dos quadros vermelhos são aquelas que apresentaram as características visuais do *Azotobacter chroococcum*.

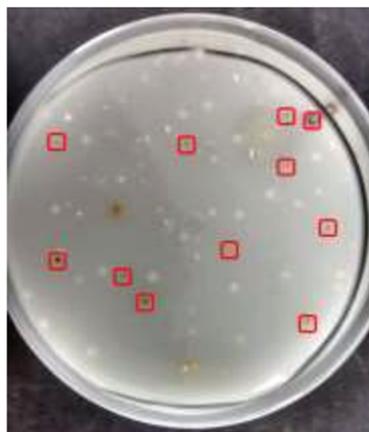


Figura 2. Identificação visual das colônias de *Azotobacter chroococcum*

Na Figura 2, também são evidentes colônias pertencentes a outros micro-organismos do solo, mas não fazem parte da espécie foco do estudo. Foi feito repique das colônias, que apresentaram as características visuais do *Azotobacter chroococcum*, para os testes bioquímicos de identificação e para ter amostras puras do micro-organismo que permitissem o preparo do inoculante. Os resultados dos testes realizados foram os mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Identificação do micro-organismo (*Azotobacter chroococcum*)

Caraterística/teste	A. Chroococcum
Coloração gram	-
Pigmentos solúveis em água	-
Mobilidade	-
Peroxidase	+
Nitrato-nitrito	+
Manitol	+
Sacarose	+
Benzoato	+

+ corresponde a 90% ou mais das cepas com resultados positivos; -, 90% ou mais das cepas com resultados negativos.

4.2.2 Preparo do inoculante

Preparou-se um litro de caldo nutritivo com a formulação da Tabela 5, sendo autoclavado para eliminação de possíveis contaminantes, como fungos ou outros micro-organismos que pudessem inibir o crescimento do *Azotobacter chroococcum*. Esse caldo foi inoculado com o micro-organismo puro, seguindo o método descrito por Benson (2001), para transferência da bactéria de um meio de cultura sólido para um meio líquido. O método consiste em selecionar as melhores colônias representativas da colônia pura que se quer reproduzir e inocular o caldo nutritivo.

Tabela 5. Formulação do caldo nutritivo para inoculação.

Reagente/produto	Quantidade/Litro	Observações
Manitol	20 g	pH final a 25°C
Dipotássio de fosfato	0,2 g	7,4±0,2
Sulfato de Magnésio	0,2 g	
Cloreto de sódio	0,2 g	
Sulfato de potássio	0,1 g	
Carbonato de cálcio	5 g	
Água destilada	1L	

Para o crescimento do micro-organismo, foi usado um *erlenmeyer*, com capacidade de 1 L, que foi tampado com um bico de pisseta para facilitar a troca de gases e protegendo outras aberturas com papel alumínio (Figura 3). Esse dispositivo usado como biorreator foi mantido em agitação à temperatura ambiente até atingir a concentração de micro-organismos desejada para o desenvolvimento da pesquisa. A concentração do micro-organismo foi medida pelo método de *Standard Plate Count* (SPC) (Figura 4), descrito por Benson (2001). O método consiste em a partir de uma amostra do inoculante fazer três diluições em base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), isto é o equivalente a pegar 1 mL do inoculante e diluir em 9 mL de água autoclavada (10^{-1}), depois pegar 1 mL dessa solução e diluir em 9 mL de água autoclavada (10^{-2}) e por último pegar 1 mL dessa solução e diluir em 9 mL de água autoclavada (10^{-3}). Dessas 3 diluições se preparam 3 placas de petri com o Agar específico para o micro-organismo o qual se quer saber a concentração em dois volumes (0,1 mL e 1 mL). No final para estabelecer a concentração se contabilizam o número de unidades formadoras de colônia e se multiplica pelo fator de cada diluição. Para o caso da diluição 10^{-3} de 1 mL se multiplica por 1.000.000.

**Figura 3. Preparo do inoculante**

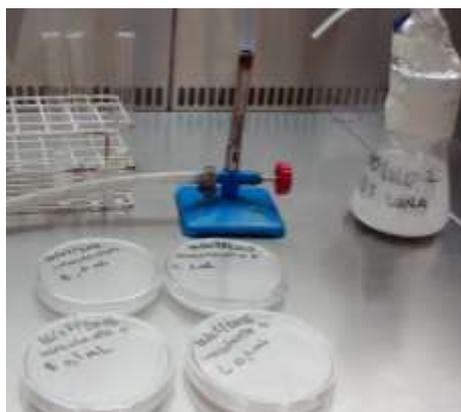


Figura 4. Análise da concentração do *Azotobacter chroococcum*.

O inoculante resultante teve uma concentração de *Azotobacter chroococcum* maior do que 1×10^9 células viáveis por mL do produto. A bactéria foi isolada de uma amostra de solo sem adubação, a mesma utilizada para a montagem do experimento na casa de vegetação. A formulação do caldo nutritivo para o preparo do inoculante apresenta-se na Tabela 5 e, na Figura 3, mostra-se o biorreator utilizado para o preparo do inoculante.

4.2.3 Inoculação das sementes

Inicialmente, foram pesados 200 g de sementes para cada tratamento, sendo selecionadas aleatoriamente da embalagem. No total, foram avaliados os resultados de quatro tratamentos aplicados às sementes: (T1) sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo, (T2) sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria, (T3) sementes esterilizadas e (T4) sementes não tratadas.

- **Tratamento 1 (T1):** foi feita esterilização com etanol a 1% e cloro comercial a 10% em imersão por 3 min, lavagem com água estéril, segundo método descrito por Pineda *et al.* (2005). Depois, as sementes foram inoculadas por meio de imersão no caldo nutritivo que contém a *Azotobacter spp.*, durante 15 min, com agitação contínua a 150 rpm (Figura 5)

- **Tratamento 2 (T2):** foi feita esterilização com etanol a 1% e cloro comercial a 10% em imersão por 3 min, lavagem com água estéril, segundo método descrito por Pineda *et al.* (2005). Depois, as sementes foram inoculadas por meio de imersão no caldo nutritivo sem bactéria durante 15 min, com agitação contínua a 150 rpm (Figura 5).

- **Tratamento 3 (T3):** esterilização com etanol a 1% e cloro comercial a 10% em imersão por 3 min, lavagem com água estéril, segundo método descrito por Pineda *et al.* (2005).
- **Tratamento 4 (T4):** as sementes não foram submetidas a nenhuma manipulação.



Figura 5. Sistema de agitação para inoculação das sementes: a direita sementes inoculadas com *Azotobacter chroococcum*, a esquerda sementes em imersão no caldo nutritivo.

Na Figura 6, apresentam-se as amostras de sementes submetidas aos tratamentos. A primeira amostra à esquerda são as sementes inoculadas com *Azotobacter chroococcum*; a segunda são as sementes que foram submetidas à imersão no caldo nutritivo; a terceira são as amostras que foram submetidas ao tratamento de esterilização e a quarta são aquelas que não foram submetidas a nenhuma manipulação.



Figura 6. Sementes tratadas.

4.3 Localização e caracterização da área de trabalho

A casa de vegetação, orientada na posição norte-sul, possui as seguintes dimensões: 6,4 m de largura, 11,0 m de comprimento, 3,0 m de pé-direito, 4,5 m de altura total até a cumeeira, uma porta com largura de 1,17 m e altura de 2,05 m; com telhado em duas águas coberto com polietileno de baixa densidade (PEBD) de 150 μm de espessura, tratado contra raios ultravioleta, difusor de luz, antivírus. É equipada com sistemas de ventilação mecânica, resfriamento evaporativo e tela termorrefletora móvel; com tela antiafídeo em todas as aberturas (exaustores e meio poroso). O controle dos sistemas por meio dos sensores de temperatura e umidade adaptados no interior da casa de vegetação o meio poroso e os exaustores, permitiu manter as condições do ambiente dentro da faixa das exigências da cultura com mínimas e máximas médias de 12°C e 35°C respectivamente, e uma umidade relativa entre 60 e 80%.

Fez-se a limpeza da área de trabalho e a colocação de um plástico na superfície do solo da casa de vegetação para evitar o crescimento de mato, o que facilitou a manipulação das plantas. Para o estabelecimento da cultura, foram usados vasos de plástico (de 1,5 L), preenchidos com solo adubado, proveniente da área experimental da FEAGRI. Foi feita análise química do solo sem adubação (Tabela 6) e a posterior correção da adubação (com 1,6 kg de termofosfato e 0,3 kg de cloreto de potássio, segundo as exigências da cultura), nenhum tipo de adubação nitrogenada foi aplicada durante o experimento, sendo necessária a adição de 1 g de sulfato de magnésio por planta para corrigir um sintoma de deficiência nutricional visual. Foram coletadas amostras do solo que foi usado no experimento para a análise das características da fertilidade. As análises de solo foram feitas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) antes do início do experimento.

Tabela 6. Resultado da análise química do solo da área experimental sem adubação prévia.

N	P	K	Ca	Mg	S	H + Al	C.T.C.
g kg^{-1}	mg dm^{-3}	mmolc dm^{-3}	mmolc dm^{-3}	mmolc dm^{-3}	mg dm^{-3}	mmolc dm^{-3}	mmolc dm^{-3}
1	15	3,1	27	8	-	27	65,1

M.O.	pH	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
g dm^{-3}	-	%	mg dm^{-3}				
25	5	59	0,28	10,4	27	14,4	1,2

M.O: Matéria orgânica; C.T.C: Capacidade de Troca Catiônica; V%: Saturação por bases.

Na Tabela 7 são apresentados valores da exportação de alguns nutrientes, segundo Rosolem e Marabuyashi (1994), o que permite ter uma ideia da demanda de nutrientes por parte do feijoeiro. Cabe ressaltar que não foi adicionado nenhum tipo de adubação nitrogenada ao longo do experimento.

Tabela 7. Quantidades médias de nutrientes exportados por 1000 kg de grãos.

Nutriente	Quantidade (kg por 1000 kg)
N	35,5
P	4,0
K	15,3
Ca	3,1
Mg	2,6
S	5,4

Fonte: adaptado de Rosolem e Marabuyashi (1994).

Os vasos foram dispostos na casa de vegetação na configuração de 10 linhas com 51 vasos por linha, com espaçamento de 22 cm entre vasos e 50 cm entre linhas.

Instalou-se um sistema de irrigação por gotejamento com microtubos tipo espaguete de 0,6 mm de diâmetro interno, 2,5 mm de diâmetro externo e parede de 0,95 mm. Distribuídos em 5 linhas de 10,50 m na largura da casa de vegetação com comprimento de 50 cm posicionados a cada 22 cm para o gotejamento dos vasos. Com um controlador, a irrigação foi ativada quatro vezes ao dia (7, 11, 13 e 16h), durante um período de 30 s, resultando em uma vazão total de aproximadamente 96mL de água por vaso por dia. Na Figura 7 mostra-se a distribuição dos vasos e o sistema de irrigação na casa de vegetação.



Figura 7. Montagem do experimento na casa de vegetação.

4.4 Qualidade fisiológica das sementes

4.4.1 Germinação e emergência

Para as análises de germinação, foi considerado o método estabelecido pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) segundo Brasil (2009) e realizados dois testes: no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita (teste de germinação) e em casa de vegetação no campo experimental (teste de emergência), da FEAGRI/UNICAMP.

No laboratório, para a análise de germinação foi usado rolo de papel como substrato para as sementes, sendo levadas à estufa com temperatura mantida em 25°C, como mostrado na Figura 8. A contagem inicial foi no quinto dia depois do início do teste e a contagem final no nono dia, considerando os critérios para plântulas normais e anormais apresentadas na Figura 9 e um mínimo de 2 centímetros de comprimento.

O delineamento experimental para o tratamento dos dados foi inteiramente ao acaso, tendo quatro tratamentos (T1, sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo; T2, sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria; T3, sementes esterilizadas; e T4, sementes não tratadas) e quatro repetições. Para cada repetição foram usadas 50 sementes.



Figura 8. Teste de germinação.

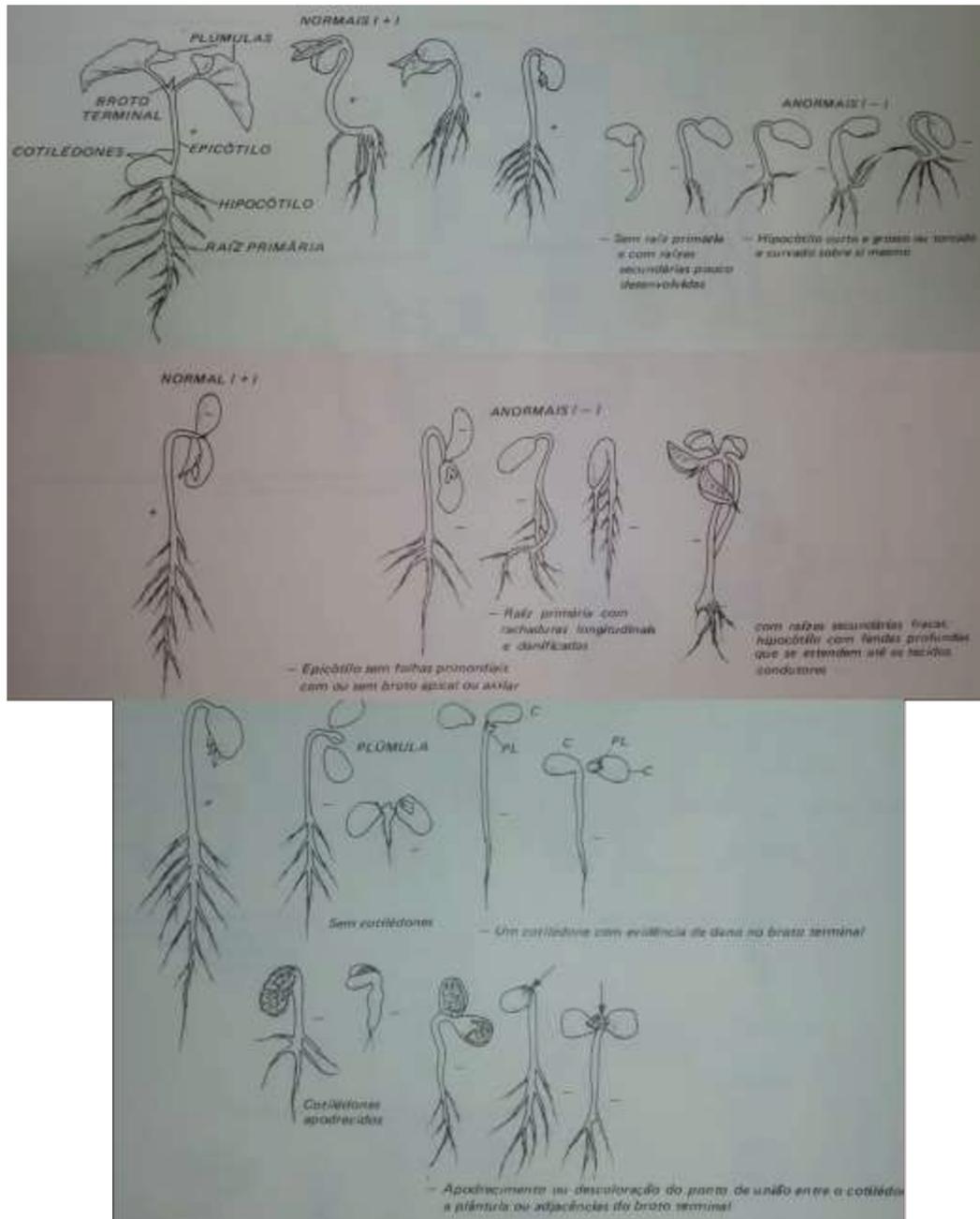


Figura 9. Categorias de anormalidades em dicotiledônea. Disponível nas RAS (Brasil, 2009)

Para a emergência das sementes na casa de vegetação, foi feita uma montagem em vasos com terra como substrato, conforme descrito na montagem do experimento na casa de vegetação. O delineamento foi em blocos ao acaso, com quatro tratamentos e quatro blocos, sendo os dados submetidos à análise de variância pelo teste F e a diferença entre as médias comparada pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, com o uso do programa Assistat. Devido às necessidades do experimento, foram avaliados 100 vasos para cada tratamento, distribuídos em grupos de 25 vasos aleatoriamente dentro de cada bloco.

Para cada vaso foram semeadas três sementes (Figura 10). Foi avaliada a quantidade de sementes que emergiram por vaso, sendo a primeira contagem feita no dia 5 depois da semeadura e a cada dia até o dia 10 considerando como emergidas aquelas plântulas cujo cotilédone aparece na superfície da terra.



Figura 10. Montagem para o teste de emergência em casa de vegetação.

4.4.2 Vigor

Para o teste de vigor, no laboratório, as sementes foram submetidas a uma temperatura de $42^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 72 h (Método de Teste de Envelhecimento Acelerado – Delouche, 1965), avaliando posteriormente o índice de germinação, de acordo com o método estabelecido pelas Regras para Análise de Sementes (RAS). Para a análise de germinação, foi usado rolo de papel como substrato para as sementes e levadas à estufa, onde se manteve uma temperatura de 25°C . A contagem inicial foi no quinto dia depois do início do teste e a contagem final no nono dia, como indicado nas RAS, para as sementes de feijão. O delineamento foi em blocos ao acaso, tendo quatro tratamentos e quatro blocos, submetidos à análise de variância pelo teste F e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Duncan com nível de significância de 5% com o uso do programa Assistat.

4.5 Desenvolvimento da cultura

4.5.1 Preparo da área de trabalho e raleamento

Para a análise do desenvolvimento do feijoeiro, foi feito um raleamento das plantas resultantes do teste de emergência na casa de vegetação, deixando uma planta por vaso. Importante ressaltar que a montagem contou com sistema de bordadura nas laterais e no fundo (Figura 11).

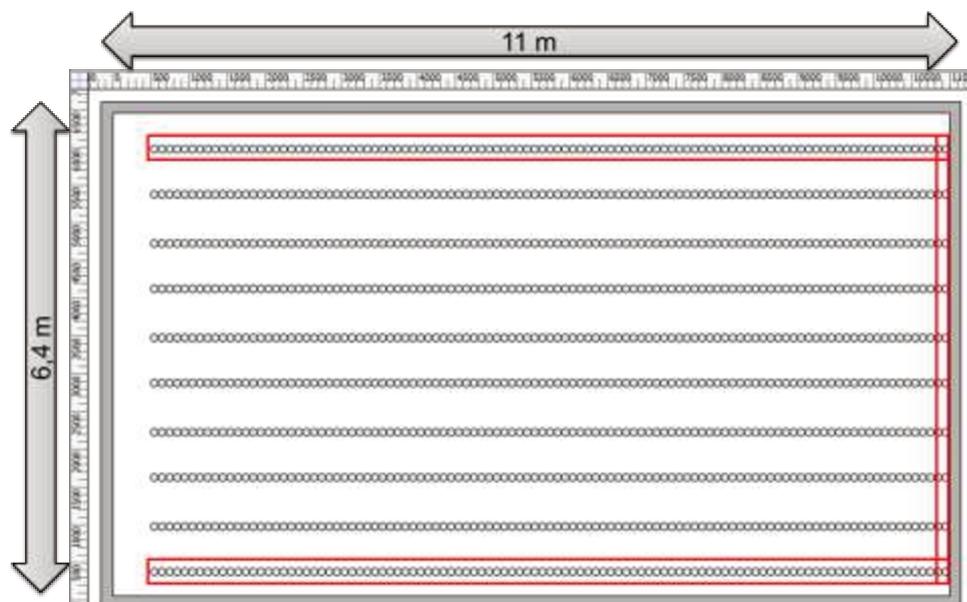


Figura 11. Distribuição dos vasos na casa de vegetação.

4.5.2 Coleta de dados

As coletas foram realizadas em seis datas diferentes, a partir do dia 35 após a semeadura e até o dia 70 com um intervalo de tempo de sete dias entre coletas. A cada coleta, foram analisadas 12 amostras por tratamento, sendo colhidas três amostras por bloco. O delineamento estatístico para o tratamento dos dados foi em blocos ao acaso com repetições, tendo 3 repetições dos 4 tratamentos e 4 blocos, e analisados por regressão polinomial em segundo grau com a ajuda do Microsoft Excel. Nesta fase, as plantas coletadas a cada dia foram escolhidas ao acaso com a ajuda da função aleatoriedade do Excel. Coletou-se o vaso inteiro, sendo cada planta retirada com cuidado do vaso e lavada. Com as plantas fora do vaso e limpas, procedeu-se a coleta dos seguintes dados:

- Massa da parte aérea seca: as amostras da parte aérea foram levadas à estufa em sacolas de papel, a 65°C, durante 72 h, e após esse tempo pesadas.
- Massa da raiz seca: as amostras da parte radicular foram levadas à estufa em sacolas de papel, a 65°C, durante 72 h, e após desse tempo pesadas.
- Massa da planta seca: somatória dos dados da massa seca da parte aérea e da massa seca da raiz.
- Comprimento da parte aérea: medida (em cm).
- Comprimento da raiz: medida (em cm).

Esses dados foram coletados nos dias 35, 42, 49, 56, 63 e 70 após a semeadura. Para a análise dos dados obtidos ao longo dos dias foi aplicada regressão quadrática.

4.6 Produção de grãos

No dia 135 após a semeadura, foram coletadas as vagens, com pelo menos 90% das vagens maduras. No total foram coletadas as vagens de 28 plantas por tratamento, sendo que a cada bloco utilizaram-se 7 plantas, cada grupo de 7 plantas foi considerado uma parcela. Cada planta foi tratada como uma amostra, das quais se consideraram o comprimento da vagem, número de grãos por vagem, número de vagens por planta, massa de 100 grãos e produção de grãos por parcela. O delineamento estatístico para o tratamento dos dados foi em blocos ao acaso, sendo quatro tratamentos e quatro blocos e foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a diferença entre as médias foi comparada pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% com o uso do programa Assistat. Estimou-se a média das 7 plantas de cada tratamento como o dado do bloco.

Na Figura 12 são visíveis as sacolas de papel usadas para coletar as vagens das plantas de feijão. Cada sacola contém as vagens de uma mesma planta.



Figura 12. Coleta de dados da produtividade.

4.7 Análise de ganho de nitrogênio nos grãos

As amostras coletadas no análise da produção de grãos foram trituradas e usadas para a determinação de proteína, segundo método para determinação de nitrogênio total de Kjendahl.

Esse método determina o N orgânico total proteico e não proteico, este último não representa muito no total na maioria dos alimentos. Usa-se um fator arbitrário que representa um fator médio para o material em estudo, que é multiplicado pelo conteúdo de nitrogênio: 6,25 para alimentos em geral. Parte-se da digestão de amostras de 0,1 g do material com ácido sulfúrico até a oxidação do carbono e o hidrogênio; em seguida, faz-se uma destilação do nitrogênio com ajuda de hidróxido de sódio a 50% (base v v⁻¹); e, finalmente, a solução é titulada com ácido clorídrico para o cálculo da porcentagem de proteína na amostra. É uma titulometria de neutralização, em que: % proteína=%N*fator, como descrito por Cecchi (2003).

Na Figura 13 são mostrados o destilador de proteína e a amostra de grãos de feijão triturada.



Figura 13. Determinação de proteína.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade fisiológica das sementes

5.1.1 Teste de germinação e teste de emergência em casa de vegetação

Os resultados do teste de germinação encontram-se na Tabela 8. Constatou-se que os resultados do teste de germinação apresentaram efeito significativo ($p < 0,01$), sem diferença estatística entre T1 e T2.

As sementes submetidas ao tratamento de inoculação com *Azotobacter chroococcum* (T1) apresentaram maior índice de germinação (93%) e uma quantidade menor de plântulas anormais (6%), quando comparadas com os outros tratamentos, melhorando a qualidade fisiológica das sementes (Tabela 8). Entretanto, os resultados da emergência sob condições favoráveis de casa de vegetação evidenciaram uma resposta similar para todos os tratamentos. Porém, verifica-se que a inoculação das sementes com *Azotobacter chroococcum* não teve efeito negativo na germinação das sementes de feijão. Em contrapartida, em estudo dirigido por Bassan *et al.* (2001) não houve efeito da inoculação com micro-organismo diazotrófico com relação à germinação e à emergência.

As sementes que não foram manipuladas (T4), teoricamente, deveriam ter apresentado um índice de germinação variável entre 60 e 74%, conforme a informação no rótulo da embalagem. No entanto, pelos resultados no laboratório, esse índice foi menor (50%). Isso sugere que a qualidade da matéria prima foi afetada por algum fator externo.

Segundo estudo dirigido por Ogata *et al.* (2008) observaram o efeito de diferentes micro-organismos na germinação de várias cultivares, sendo o *Azotobacter spp.* um dos micro-organismos usado como inoculante e dois cultivares de feijão foram também parte do estudo. No trabalho, os autores observaram que a maioria das cepas aumentou a porcentagem de germinação das cultivares em comparação com o tratamento sem inoculação. Em feijão Canario camanejo os tratamentos com inoculação apresentaram índices de germinação maiores quando comparados com o padrão, com valores acima de 90%. E para feijão Caraota 22% dos tratamentos apresentaram aumento significativo no índice de germinação de até 137%, porém 78% apresentaram um comportamento similar ao tratamento sem inoculação. Os autores sugerem também que as cepas de *Azotobacter spp.* poderiam ser utilizadas num sistema de monocultura.

Tabela 8. Número de sementes germinadas e índice de germinação de plântulas normais e anormais, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizada) e T4 (sementes não tratadas).

Tratamento	Número de sementes germinadas				Índice de germinação (%)	
	Normal	**	Anormal		Normal	Anormal
T1	47	a	3	c	93	6
T2	44	a	6	c	88	11
T3	35	b	16	b	69	31
T4	25	c	25	a	50	49

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Aplicado Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar das diferenças entre os índices de germinação, os resultados da emergência sob condições favoráveis da casa de vegetação evidenciaram uma resposta similar para todos os tratamentos (Figura 14) sem efeito significativo dos tratamentos. Observou-se na Figura 14 que foi superado o índice de germinação teórico de 74%, 6 dias após a semeadura, para todos os tratamentos. Todas as sementes, inclusive as tratadas, têm a aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de casa de vegetação.

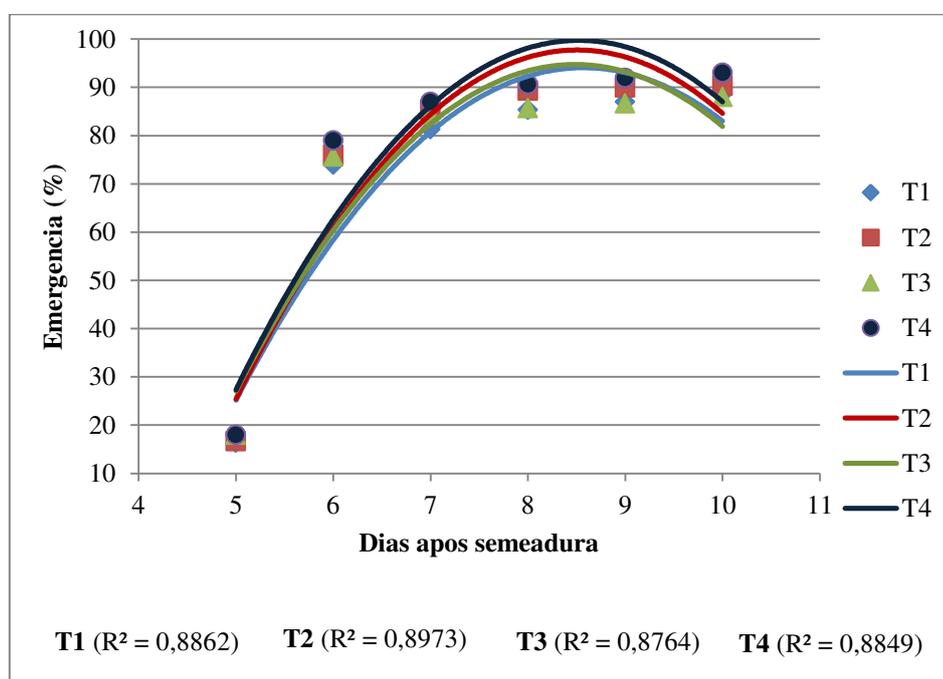


Figura 14. Comportamento da Emergência das sementes de Feijão Carioca em condições favoráveis de casa de vegetação, submetidas a diferentes tratamentos (T1, sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo; T2, sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria; T3, sementes esterilizadas; e T4, sementes não tratadas).

As equações para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram $y = -302,86 + 92,633x - 5,4048x^2$; $y = -328,14 + 100,14x - 5,8869x^2$; $y = -306,76 + 94,642x - 5,5774x^2$; e $y = -324 + 99,433x - 5,8333x^2$ respectivamente. Os R^2 estão apresentados na Figura 14. As curvas apresentam um comportamento simulado que evidencia um ponto máximo de emergência, isto permite inferir a porcentagem de plântulas emergidas em determinado ponto da curva, nas condições controladas da casa de vegetação.

5.1.2 Vigor

Em geral, os resultados do índice de germinação das sementes expostas a temperatura e umidade elevada apresentaram valores abaixo dos obtidos na análise do índice de germinação inicial, concordando com o estudo de Binotti *et al.* (2008). Os autores explicaram que quanto maior é o período de exposição das sementes a um ambiente adverso maior sua taxa de deterioração.

Os resultados após o teste de vigor (Tabela 9) mostraram que as sementes inoculadas com a bactéria (T1) apresentaram maior índice de germinação (73%), ficando dentro do intervalo teórico para a cultivar (60-74%), e menor porcentagem de plântulas anormais (16%) quando comparado com o T4 (32%).

Tabela 9. Teste de vigor: valores médios em porcentagem (%) de plântulas normais, plântulas anormais, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Tratamento	Número de sementes germinadas				Teste de vigor (%)	
	Normal	*	Anormal	**	Normal	Anormal
T1	36	a	8	b	73	16
T2	34	ab	8	b	69	15
T3	30	b	14	a	60	29
T4	29	b	16	a	57	32

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Aplicado o Teste de Duncan ($p < 0,05$) e ($0,01 \leq p < 0,05$).

Teoricamente, a matéria prima (T4) deveria ter tido um índice de germinação não menor a 60% sob condições normais, concordando com os resultados obtidos na análise de germinação inicial, indicando que a matéria prima foi afetada por algum fator externo.

Constata-se que os tratamentos tiveram um efeito significativo (Tabela 9), sendo que os tratamentos T1 e T2 não apresentaram diferença estatística entre eles, assim como os tratamentos T2, T3 e T4.

Num estudo dirigido por Crusciol *et al.*(2003), em que foram aplicadas doses de nitrogênio (N) na sementeira, os resultados não se mostraram consistentes quanto aos seus efeitos sobre a qualidade fisiológica das sementes, avaliada logo após a colheita. Os autores afirmaram que não houve efeito favorável da adubação nitrogenada sobre a germinação e o vigor de sementes de feijão, mas que o efeito positivo da inoculação com *Azotobacter spp.* na qualidade fisiológica das sementes de feijão pode ser atribuída à sua capacidade de segregar hormônios promotores do desenvolvimento da planta em suas fases iniciais e não por sua capacidade para fixar o nitrogênio. Isto coincide com os resultados obtidos neste trabalho, a inoculação das sementes com *Azotobacter chroococcum* teve efeito positivo na germinação e no vigor das sementes de Feijão Carioca, mas não se teve efeito significativo para os tratamentos na emergência em casa de vegetação.

5.2 Desenvolvimento da cultura

Para avaliar o desenvolvimento do feijoeiro submetido aos tratamentos, foram analisados os dados coletados durante o período de velocidade máxima de absorção do nitrogênio, o que representa o período de tempo entre os dias 35 e 50 após a sementeira (Rosolem e Marubayashi, 1994). Esse período, que foi estendido para obter informação, permitiu interpretar graficamente o comportamento das variáveis ao longo do período de coleta dos dados.

A inoculação das sementes de feijão não afetou o ganho de massa da planta seca, nem estimulou um ganho maior ou mais rápido (Figura 15), concordando com Gitti *et al.* (2012), mas discordando de Bassan *et al.* (2001).

Gitti *et al.* (2012) avaliaram o desenvolvimento e os componentes de produção e produtividade na presença ou ausência de inoculação de diferentes cultivares de feijão com *Azospirillum brasilense* e o fornecimento de nitrogênio no período de inverno. Os autores verificaram que a inoculação não influenciou o desenvolvimento das plantas. Bassan *et al.* (2001), por outro lado, estudaram os efeitos da inoculação de sementes com *Rhizobium tropici*, a aplicação de nitrogênio e de molibdênio no feijão no inverno e observaram que a inoculação promoveu acréscimo na massa das plantas secas.

Observa-se que o comportamento do ganho de massa da planta inteira seca seguiu o mesmo padrão crescente nos 4 tratamentos (Figura 15). No entanto, as curvas alternaram os resultados de maiores ganhos ao longo do período de coleta dos dados: entre os dias 35 e 42, o tratamento 1 apresentou o maior ganho; entre os dias 42 e 63, os tratamentos 2 e 3 destacaram-se; e após o dia 63, o tratamento 4.

As equações que representam o ganho de massa seca durante o período de análise para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram $y = 3,1441 - 0,1786x + 0,0034x^2$; $y = -3,1188 + 0,0694x + 0,0011x^2$; $y = -2,181 + 0,0335x + 0,0014x^2$; e $y = 4,2985 - 0,247x + 0,0042x^2$ respectivamente. Os R^2 estão apresentados na Figura 15.

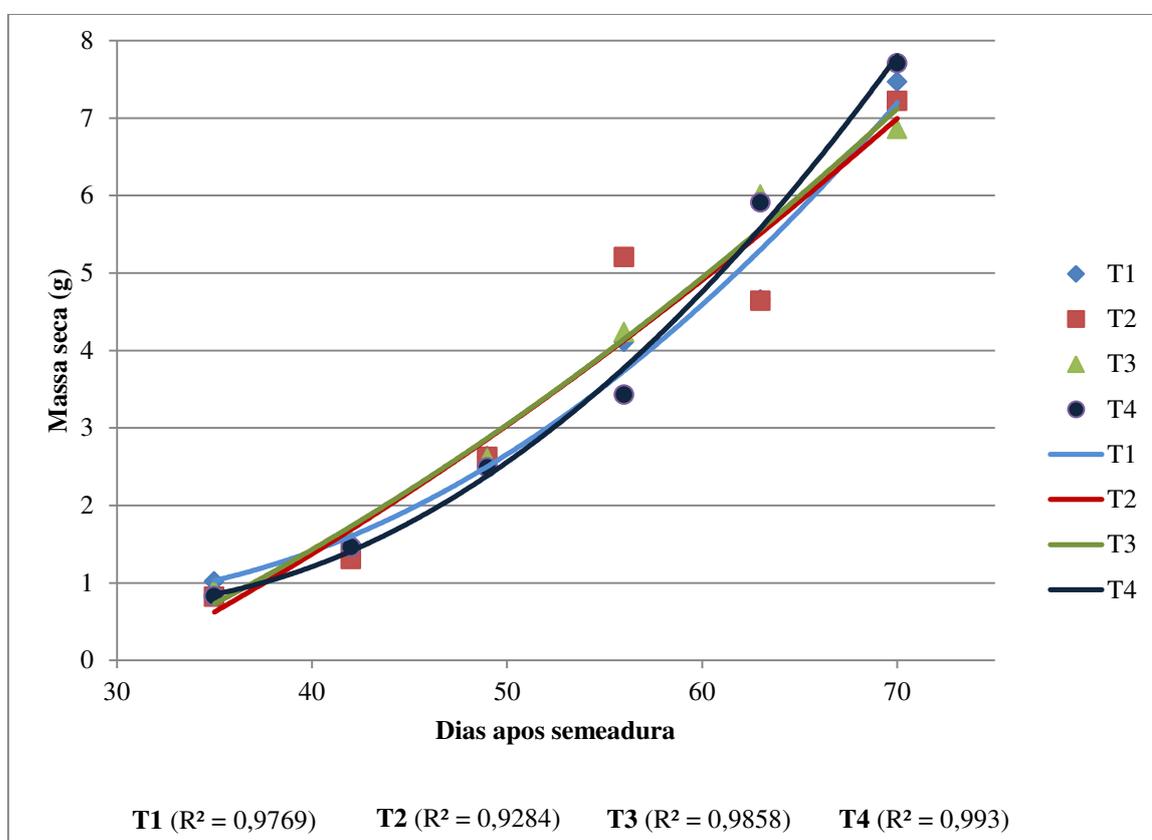


Figura 15. Ganho de massa seca do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Na Figura 16, observa-se que o comportamento do ganho de massa na parte aérea seca também seguiu o mesmo padrão crescente nos 4 tratamentos, semelhante ao comportamento de ganho na planta inteira mostrado na Figura 15. As curvas também alternaram os resultados de maiores ganhos ao longo do período de coleta dos dados: entre os

dias 35 e 42, o tratamento 1 apresentou o maior ganho; entre os dias 42 e 63, os tratamentos 2 e 3 destacaram-se; e após o dia 63, o tratamento 4.

Esses comportamentos coincidem com os apresentados na análise do ganho de matéria seca na planta inteira, sendo que a parte aérea representa a maior porcentagem de matéria seca da planta.

As equações que representam o ganho de massa seca durante o período de análise para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram $y = 3,6476 - 0,2023x + 0,0034x^2$; $y = -1,9103 + 0,0196x + 0,0013x^2$; $y = -1,045 - 0,013x + 0,0016x^2$; e $y = 4,5922 - 0,258x + 0,0041x^2$ respectivamente. Os R^2 estão apresentados na figura 16.

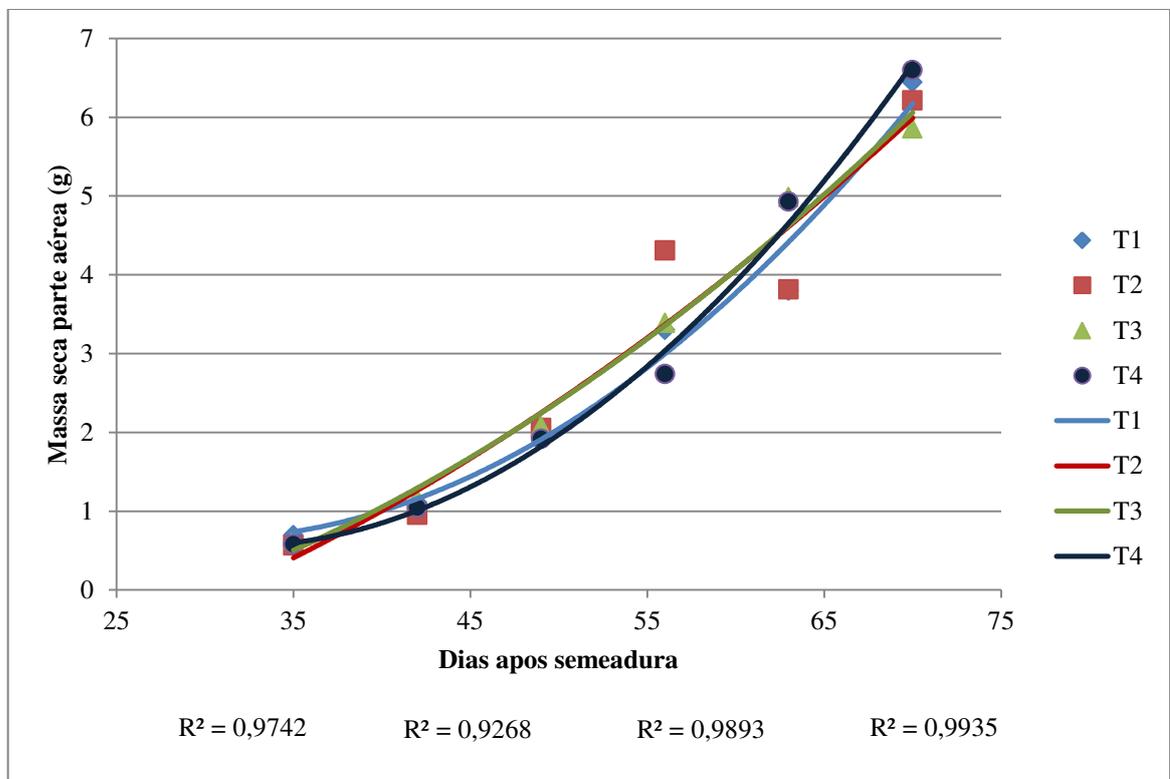


Figura 16. Ganho de massa seca na parte aérea do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Na figura 17, observa-se que o comportamento do ganho de massa seca na parte radicular atende, visualmente, a um padrão crescente mais linear. No entanto, o modelo polinomial de segundo grau simulou melhor o comportamento, já que os valores do R^2 para esse modelo foram mais próximos a 1. As curvas também alternaram os resultados de maiores ganhos ao longo do período de coleta dos dados: entre os dias 35 e 42, o tratamento 1 apresentou o maior ganho; entre os dias 42 e 63, os tratamentos 2 e 3 destacaram-se; e após o

dia 63, o tratamento 4. Esses comportamentos simulados coincidem com os apresentados na análise do ganho de matéria seca na planta inteira e na parte aérea.

As equações que representam o ganho de massa seca durante o período de análise para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram $y = -0,5036 + 0,0237x - 3E-05x^2$; $y = -1,2085 + 0,0498x - 0,0003x^2$; $y = -1,136 + 0,0465x - 0,0002x^2$; e $y = -0,2937 + 0,011x + 0,0001x^2$, respectivamente. Os R^2 estão apresentados na Figura 17.

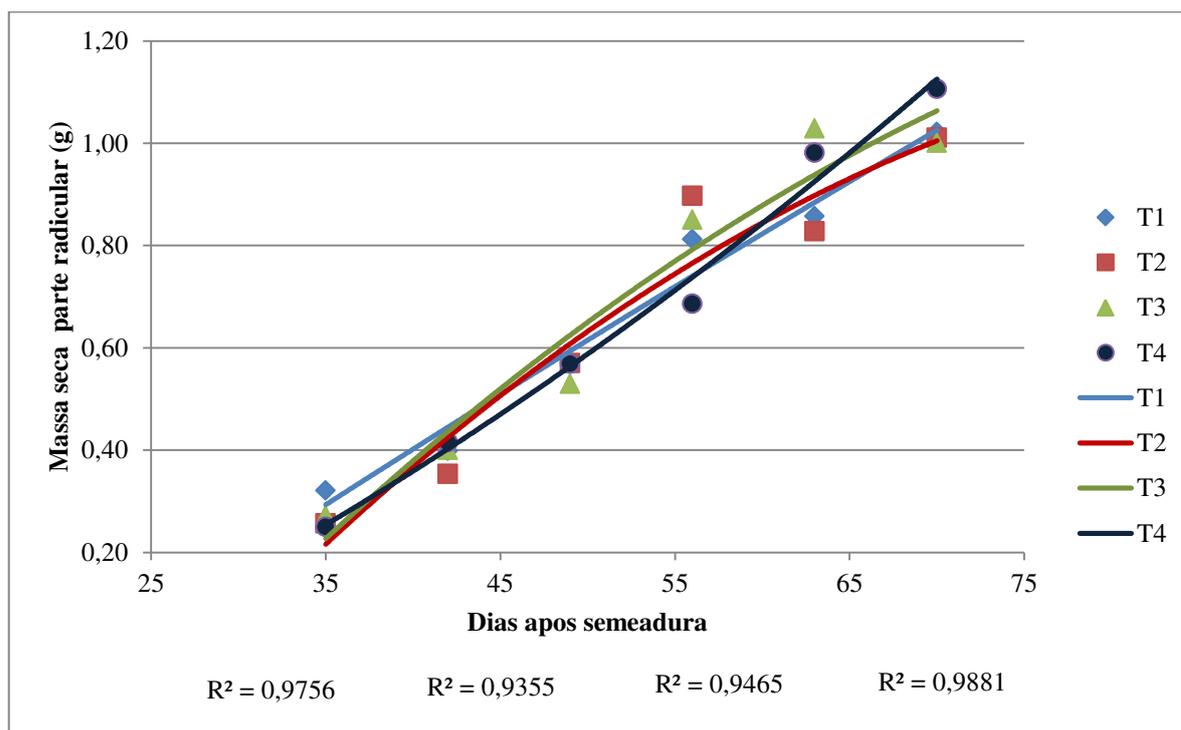


Figura 17. Ganho de massa seca na parte radicular do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Na Figura 18, observa-se o crescimento da parte aérea do feijoeiro, pelo seu comprimento, para os quatro tratamentos. Para os tratamentos 2, 3 e 4, o padrão simulado é com tendência crescente; enquanto para o tratamento 1, a tendência é a de se estabilizar.

As curvas também alternaram os resultados de maiores alongamentos ao longo do período de coleta dos dados: entre os dias 35 e 56, os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram o maior comprimento; após esse período, os tratamentos 2, 3 e 4 continuaram crescendo até o dia final das coletas; enquanto o tratamento 1 estabilizou o alongamento. Esse comportamento, associado ao fato de que para os mesmos dias o ganho de massa continuou aumentando, indica que a planta aproveitou a energia para o desenvolvimento das vagens e o enchimento dos grãos.

Em estudos dirigidos por Nieto e Frankenberger (1991) e Kappes *et al.* (2013), em milho, a inoculação das sementes com *Azotobacter chroococcum* e *Azospirillum brasilense* respectivamente proporcionou maior altura de planta e de inserção de espiga, sendo que isso foi devido à produção de substâncias promotoras de crescimento geradas pelas bactérias e não devido à fixação biológica do nitrogênio, concordando com o comportamento do crescimento do feijão no período de florescimento (35-50 dias após semeadura).

As equações que representam o alongamento durante o período de análise para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram: $y = -263,63 + 11,006x - 0,0832x^2$; $y = -151,37 + 5,963x - 0,0275x^2$; $y = -184,36 + 7,319x - 0,0417x^2$; e $y = -101,15 + 3,5736x - 0,0029x^2$, respectivamente. Os R^2 estão apresentados na Figura 18.

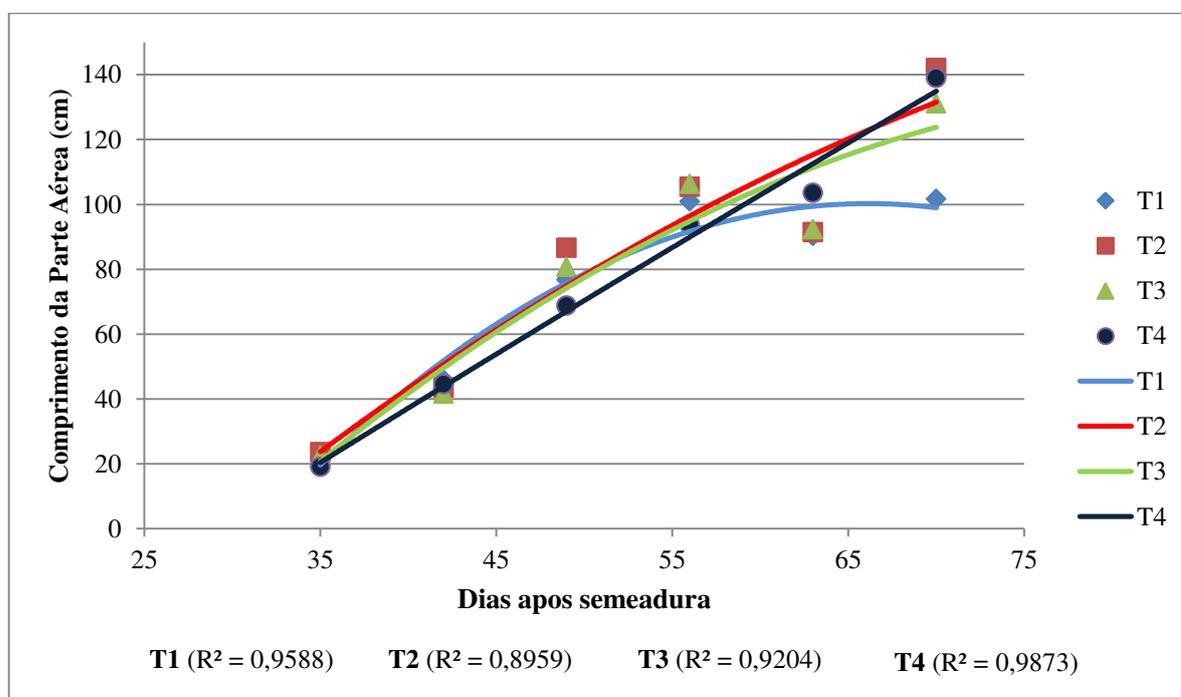


Figura 18. Alongamento na parte aérea do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Especificamente para o resultado do tratamento 1, entre o período dos dias 49 e 56, em que o comprimento da parte aérea começou a estabilizar, o comprimento da parte radicular teve seu maior pico, como mostrado na Figura 19. Oposto ao comportamento no ganho de massa da parte radicular seca, o comprimento das raízes não atende a um padrão crescente. Isso se explica devido à presença de nodulação simbiótica presente nas raízes, que fazem parte da matéria dessa parte da planta. Esses nódulos ocorreram em todos os tratamentos ao longo dos dias, segundo análise visual e sustentado pelo resultado do ganho de

massa, o que evidencia que a inoculação das sementes de feijão carioca não afeta negativamente o desenvolvimento da simbiose natural da cultura. Essa observação concorda com os resultados de Araújo *et al.* (2007), em que a cultivar de feijão carioca apresentou boa resposta à inoculação, demonstrando bons índices de nodulação.

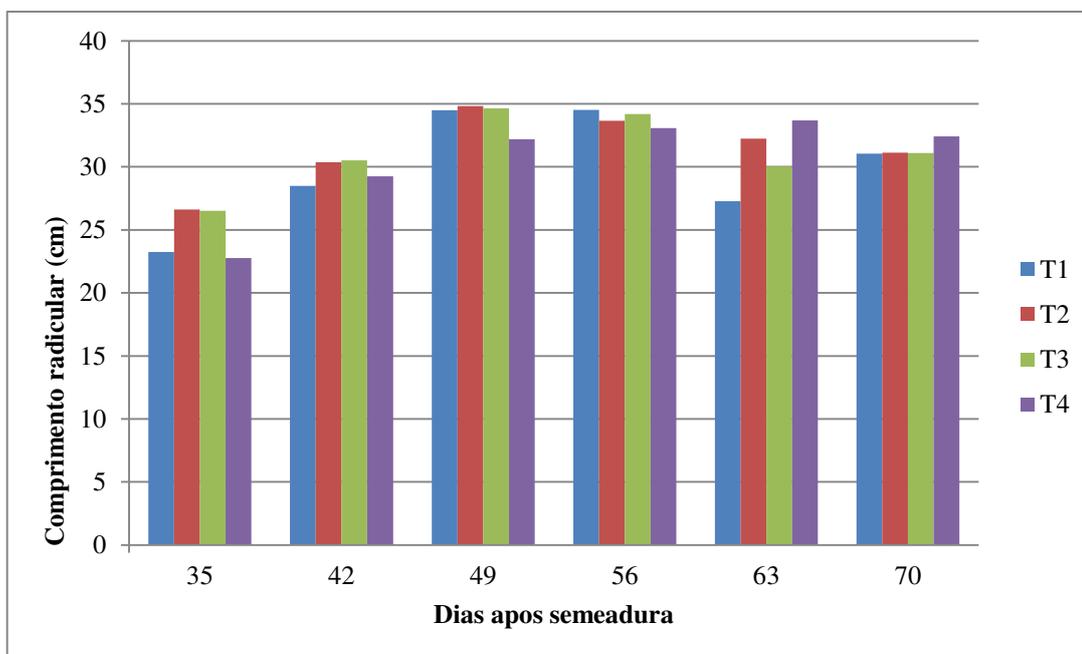


Figura 19. Alongamento na parte radicular do Feijoeiro para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

5.3 Produção de grãos

A produtividade é um fator muito relevante na avaliação da qualidade de uma cultura. As variáveis estudadas foram mostradas na Tabela 10.

Estatisticamente, os tratamentos não tiveram efeito significativo sobre o comprimento das vagens, o número de grãos por planta, o peso de 100 grãos e o conteúdo de proteína nos grãos, concordando com Gitti *et al.* (2012), que observaram que a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* não influenciou os componentes de produção e produtividade do feijoeiro com uma produtividade de grãos de 2.245 kg ha⁻¹, e com Arf *et al.* (2011), em que a inoculação das sementes de feijão com *Rhizobium tropici* não alterou a produtividade apresentando valores entre 3.480 e 3.752 kg ha⁻¹ nos anos 2006 e 2007.

No entanto, esses resultados discordaram de Araújo *et al.* (2007), em que a cultivar de feijão carioca apresentou boa resposta à inoculação e bons índices de produtividade com valores entre 1.386 e 1.783 kg ha⁻¹. Vale ressaltar que esses estudos

diferem deste trabalho no sentido que foram dirigidos em campo, com diferentes micro-organismos diazotróficos e tiveram adubação nitrogenada, ao contrário deste trabalho que foi dirigido em casa de vegetação, em vasos e sem adubação nitrogenada, o que explica a grande diferença nos valores da produtividade.

Entretanto, obteve-se resultado significativo no efeito dos tratamentos sobre o número de vagens por planta (Tabela 10), o que indicou que a inoculação das sementes não foi melhor tratamento do que as sementes que não foram manipuladas, em concordância com Bassan *et al.* (2001), que observaram que o número de vagens por planta e sementes por vagens foi maior na ausência de inoculação.

Tabela 10. Valores médios obtidos para as variáveis de produtividade, para os tratamentos T1 (sementes inoculadas com micro-organismo e caldo nutritivo), T2 (sementes inoculadas com caldo nutritivo sem bactéria), T3 (sementes esterilizadas) e T4 (sementes não tratadas).

Tratamento	Nº vagens	Comprimento vagem (cm)	Nº grãos por planta	Massa 100 grãos (g)	Massa grãos (g)/parcela					
	*	ns	ns	ns	ns					
T1	4,0	b	9,1	a	14	a	29,94	a	29,4	a
T2	4,9	ab	8,2	a	18	a	29,07	a	34,9	a
T3	4,3	ab	8,4	a	17	a	28,30	a	32,2	a
T4	5,3	a	8,5	a	19	a	29,21	a	39,8	a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As sementes que não foram manipuladas ou as sementes do tratamento 4, foram as que apresentaram o maior número de vagens por planta (média de 5 vagens por planta) e as sementes inoculadas com a bactéria ou sementes do tratamento 1 apresentaram o menor número de vagens por planta (média de 4 vagens por planta), o que discorda de Kappes *et al.* (2013) em que a inoculação das sementes de milho proporcionou resultados positivos para a produção de grãos, mas concorda com os autores em que o peso de 100 grãos não é influenciada pelo tratamento.

Obteve-se uma correlação significativa entre o número de vagens por planta e o número de grãos, com uma relação positiva entre eles (Tabela 11). Quando uma planta apresentar maior número de vagens, também apresentará o maior número de grãos, sendo que as duas variáveis apresentaram um comportamento crescente com relação aos tratamentos, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 11. Correlação simples entre as variáveis de produtividade: N. VA (número de vagens), COMP (comprimento de vagens); N. GR (número de grãos por planta); MASSA (massa de 100 grãos); CONT (conteúdo de proteína).

CORRELAÇÃO	COEF.CORR(r)	SIGNIF.
N. VA x COMP.	-0,64	ns
N. VA x N. GR	0,95	*
N. VA x MASSA	-0,17	ns
N. VA x CONT.	0,77	ns
COMP. x N. GR	-0,78	ns
COMPx MASSA	0,78	ns
COMP. x CONT.	-0,07	ns
N. GR x MASSA	-0,45	ns
N. GR x CONT.	0,67	ns
MASSAx CONT.	0,20	ns

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$). ns não significativo ($p \geq 0,05$).

As sementes sem manipulação (T4) apresentaram o maior número de grãos com um valor médio aproximado de 19 grãos por planta e as sementes inoculadas com *Azotobacter chroococcum* apresentaram o menor número, com um valor médio aproximado de 14 grãos, como apresentado na Tabela 10.

Os tratamentos não apresentaram efeito significativo com relação ao conteúdo de proteína (Figura 20), o que concorda com os resultados obtidos por Ambrosano *et al.* (1999), em que o fornecimento diferencial de nitrogênio ou de outros micronutrientes não afetaram o acúmulo ou o déficit de elementos nutrientes nas sementes de feijão após a colheita (grãos).

As sementes submetidas somente à esterilização (T3), desenvolveram plantas que apresentaram o menor conteúdo de proteína nos grãos com um valor médio de 23,1% como mostrado na Figura 20. As plantas das sementes que não foram manipuladas (T4) tiveram o maior conteúdo com uma porcentagem média de 24,4% de proteína. Os tratamentos 1 e 2 apresentaram conteúdos médios de 23,3% cada.

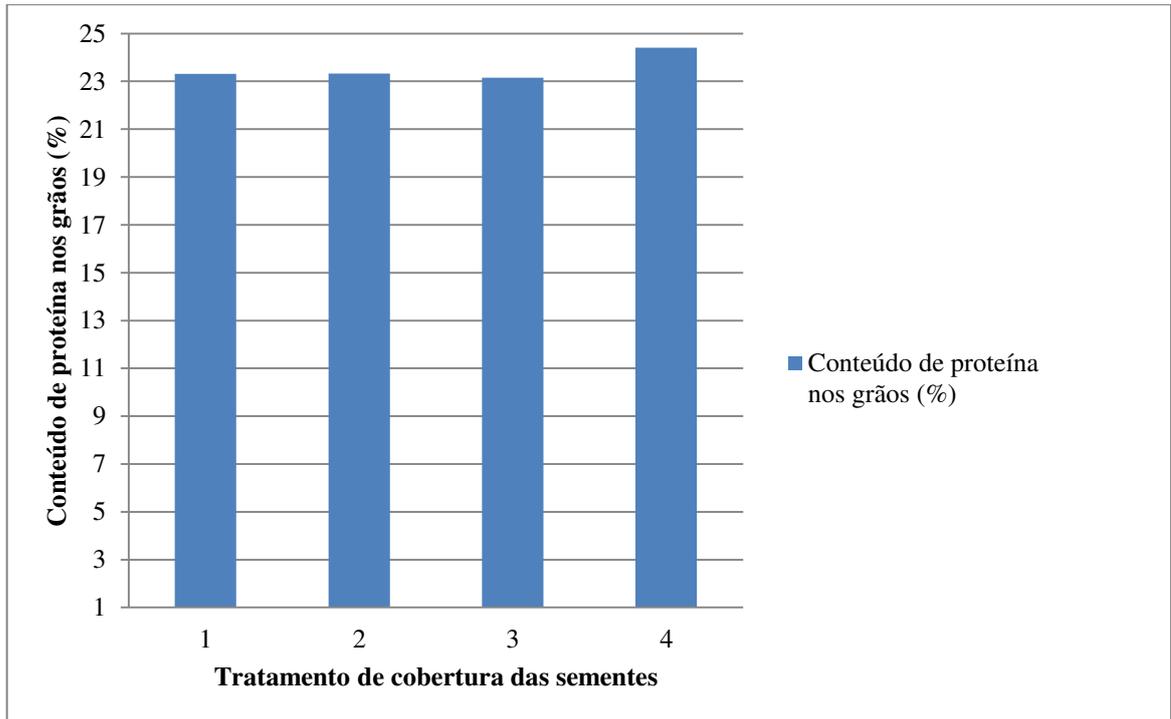


Figura 20. Conteúdo de proteína nos grãos de Feijão carioca em função do tratamento.

CONCLUSÕES

A inoculação com *Azotobacter chroococcum* promove a qualidade fisiológica das sementes de feijão, beneficiando as características de germinação e vigor.

A nodulação natural, representante da simbiose entre os micro-organismos do solo e as raízes das plantas, o desenvolvimento das plantas, a produção e o conteúdo de proteína nos grãos de feijão não são afetados pela inoculação das sementes com *Azotobacter chroococcum*.

BIBLIOGRAFIA

AMBROSANO, E. J.; AMBROSANO, G. M. B.; WUTKE, E. B.; BULISANI, E. A.; MARTINS, A. L. M.; SILVEIRA, L. C. P. *Bragantia*. Campinas, v. 58, n. 2, p. 393-399. 1999.

ANDRADE, M.; CORREA, C.; CUEVA, P. Producción de un Biofertilizante a partir de cepas *Azotobacter spp.* aisladas de plantaciones de *Stevia Rebaudiana*. Ecuador, 2009.

ARAÚJO, F. F.; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S.; CRESTE, J. E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico das sementes comparado à adubação nitrogenada. *Acta Sci. Agron.*, Maringá, v. 29, n. 4, p. 535-540. 2007.

ARF, O.; SILVA, F. C. R.; ARF, M. V.; RODRIGUES, R. A. F.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Preparo do solo, inoculação de sementes e doses de nitrogênio em cobertura no feijoeiro comum de inverno irrigado. *Scientia Agraria*, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 135-142. 2011.

BASSAN, D. A. Z.; ARF, O.; BUZETTI, S.; CARVALHO, M. A. C.; SANTOS, L. C. B.; SÁ, M. E. inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, Selvíria, v. 23, n. 1, p. 76-83. 2001.

BENSON: *Microbiological Applications: Laboratory Manual in general Microbiology*, Eighth Edition. The McGraw-Hill, 478 p. 2001.

BINOTTI, F. F. S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SÁ, M. E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. *Act. Sci. Agron.*, Maringá, v. 30, n. 2, p. 247-254. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009. ISBN 978-85-99851-70-8.

CASTELLANOS, W.L. Caracterización de la capacidad de innovación de los actores involucrados en los sistemas de producción de hortalizas bajo ambiente controlado, en la Región Trifinio (Honduras, Guatemala y El Salvador). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtén por el título de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica, 2009.

CECCHI, H. M. Nitrogênio e conteúdo proteico. In: Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2^{da} edição. Brasil, Campinas, SP. Editora da Unicamp, 2003. p. 61-68.

CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura. Dados meteorológicos. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html/>>. Acesso em: 02/03/2016.

CRUSCIOL, C. A. C.; LIMA, E. D.; ANDREOTTI, M.; NAKAGAWA, J.; LEMOS, L. B.; MARUBAYASHI, O. M. Efeito do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica, produtividade e características de sementes de feijão. Revista Brasileira de Sementes, v. 25, n. 1, p.108-115, 2003.

DENARDIN, N. fixação biológica de nitrogênio em interação com produtos fitossanitários, químicos e biológicos, por leguminosas. Avanços no tratamento e recobrimento de sementes. Informativo. ABRATES, Brasil; v. 20, n. 3, p. 62-69. 2010.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Seção: solos. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasil, v. 1, p. 357-365. 1966.

Embrapa Arroz e Feijão. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira : 2012-2014. Editores: Flávia Rabelo Barbosa, Augusto César de Oliveira Gonzaga. Santo Antônio de Goiás. 2012. 247 p (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos), ISSN 1678-9644.

FERNANDES, N. Ferramentas para qualidade de sementes no tratamento de sementes profissional. Avanços no tratamento e recobrimento de sementes. Informativo. ABRATES, Brasil; v. 20, n. 3, p. 56. 2010.

FERREIRA, J. Influência do oligochaeta edáfico *Amyntas spp.* E do *Rhizobium tropici* no Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*). Dissertação apresentada como requisito parcial á obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-graduação em Agronomia. Brasil, Curitiba, 1998.

FERREIRA, F. *Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Agronomia do centro de Ciências Agrarias da universidade Federa do Piauí, para a obtenção do título de mestre em agronomia. Brasil, Teresina, PI. 2010.

FERREIRA, C.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. Sistemas de Produção, 2. Cultivo do feijoeiro comum: Mercado e comercialização. Embrapa Arroz e Feijão, Janeiro de 2003. Versão eletrônica. ISSN 1679-8869.

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. Revista Agrarian, Dourados, v. 5, n. 15, p. 36-46. 2012. ISSN: 1984-2538.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos / Embrapa Soja, n.325) ISSN 1516-781X.

JIMENEZ, D. Caracterización molecular de cepas nativas Colombianas de *Azotobacter spp.* mediante el análisis de restricción del DNA Ribosomal 16S. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obter por el título de Microbiologo Industrial. Colombia, Ago. 2007.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. Semina: Ciências Agrarias, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538. 2013.

KUSS, A.V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Tese apresentada ao curso do doutorado do programa de Pos-graduação em ciências do solo, Área de concentração em biodinâmica e manejo do solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em ciência do solo. Brasil, Santa Maria, RS. 2006.

Laboratorio AGRODIAGNOSTIC de la ciudad de Quito. Producción de biofertilizante fase laboratório. [online] Ecuador, Quito, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1214/6/T-ESPE-025024.pdf>> Acesso em: 28 Jan 2014. p

LOBO, M. J.; BRANDÃO, L. T. D.; MARTINS, B. E. M. Testes para Avaliação da Qualidade de Sementes de Feijão Comum Bárbara Estevam de Melo. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2013. 4p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular técnica, 90).

LÓPEZ, V. M. H.; VÁZQUEZ, M. L. P. V.; MARTÍNEZ, J. S. M.; DELGADO, S. H.; PÉREZ, N. M. Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. Revista Fitotecnica de Mexico. Mexico; v. 36, n. 2, 10 p. 2013.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Brasil, 2003.

MENTEN, J.; MORAES, M. Tratamento de sementes: Histórico, tipos, características e benefícios. Avanços no tratamento e recobrimento de sementes. Informativo. ABRATES, Brasil; v. 20, n. 3, p. 52-53. 2010.

NIETO, K. F.; FRANKENBERGER, W. T. Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. Plant and Soil, Riverside-CA, v. 135, p. 213-221. 1991.

OGATA, K.; ARELLANO, C.; ZUÑIGA, D.. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. Peru, 2008.

PINEDA, J.; HERNANDEZ, A.; GONZALEZ, A.; BARRIENTOS, V.; NASS, H.; GIL, E. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz ante *Rhizoctonia solani* Kühn. Bioagro, Venezuela; v. 17, n. 2, p. 93-98. 2005.

RABELO, F. OLIVEIRA, A.C. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, n.272) ISSN 1678-9644.

RICHETTI, A.; PEREIRA C. L.; PALHANO J. Viabilidade Econômica da Cultura do Feijão Comum, Safra 2012, em Mato Grosso do Sul. Dourados, MS. Dezembro, 2011. (Comunicado Técnico, 173) ISSN 1679-0472.

ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. seja o doutor do seu feijoeiro. Arquivo do Agrônomo, Botucatu; n. 7, 18 p. dez. 1994.

SILVA, C. C. Sistemas de Produção, 2. Cultivo do feijoeiro comum: Plantio. Embrapa Arroz e Feijão, Janeiro de 2003. Versão eletrônica. ISSN 1679-8869.

TORRES, R.G.; SORIA, E.M.A.; PEREZ, C.N.; GARCIA. J.I. Incrementos En La Fijación Biológica De N₂ Atmosférico En El Cultivo Del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Mediante La Inoculación Combinada De Bacterias Diazotróficas. Cuba, Santo Domingo, 2002.

Universitat de Barcelona. ANGURELL, I.; CASAMITJANA, N.; CAUBET, A.; DINARES, I.; LLOR, N.; MUÑOZ, D.; NICOLAS, E.; PEREZ, M.; PUJOL, M.; ROSELL, G.; SECO, M.; VELASCO, D. 11. Centrifugación 11.2 Tipos de centrifugación in Operaciones básicas en el laboratorio de química [online] Disponible en: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/centrifugacio_tipus.html# Acesso em: 09 Fev 2014.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP. Brasil, 164 p.1994.

VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Ed.). Sementes de feijão: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 270 p.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas spp.* Fluorescentes-Bacterias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 32 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127). ISSN 0104-6187.