



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

IARA BARROS SILVA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO  
DA RIZOSFERA DO  
MELOEIRO (*Cucumis melo*)**

**MOSSORÓ-RN**

**2016**

IARA BARROS SILVA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO  
DA RIZOSFERA DO  
MELOEIRO (*Cucumis melo*)**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal Rural do  
Semiárido (UFERSA), como  
exigência final para obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda  
Matias

**MOSSORÓ/RN**

**2016**

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S586i Silva , Iara.

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE  
NITROGÊNIO DA RIZOSFERA DO MELOEIROS (Cucumis

Melo) / Iara Silva . - 2016.

37 f. : il.

Orientadora: Fernanda Matias.

Monografia (graduação) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia, 2016.

1. Melão. 2. Fixação de Nitrogênio. 3.  
Bactérias de vida livre. I. Matias, Fernanda ,  
orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas

da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

IARA BARROS SILVA

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE  
NITROGÊNIO DA RIZOSFERA DO MELOEIRO (*Cucumis melo*)

Monografia apresentada a  
Universidade Federal Rural do  
Semiárido como requisito para  
obtenção do título de Bacharel  
em Biotecnologia.

Defendida em: 10 / 11 / 2016.

BANCA EXAMI.NADORA

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Matias (UFERSA)  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto (UFERSA)  
Membro Examinador

Prof<sup>o</sup> Dr. Rui Sales Júnior  
(UFERSA) Membro  
Examinador

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por sempre me dar forças para continuar essas batalhas árduas da vida, mesmo nos momentos de desistência não me abandonou.

A minha mãe, Tânia Cristina Pinheiro Barros Silva, e meu pai, Ildemar Augusto da Silva, por todo esforço para que eu conseguisse chegar até aqui e por todas as conversas e conselhos que me fortaleceram a cada dia para concluir essa etapa da minha vida.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Fernanda Matias, muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos da base acadêmica e por apoiar na decisão do meu estágio fora, foram suas palavras que me fizeram acreditar, serei eternamente grata.

Minhas companheiras fieis de curso: Ana Kelly por ser minha duplinha em todos os trabalhos e seminários. Aline Maria por você me amar e me odiar por todos esses anos, mas as coisas sempre foram assim e nunca vai mudar, já diziam os astros. Anny Jasmine, obrigada por tudo, pelas dúvidas tiradas, por todas as caronas até minha casa, pelo companheirismo nos experimentos do TCC. Deyze e Linéa, você duas eu não sei por onde começo a agradecer, estamos juntas desde o começo, vocês duas foram meus pilares nessa graduação, sem vocês nada teria graça.

Fabiana Rodrigues, minha florzinha, obrigada por cada palavra de incentivo, por cada dúvida tirada, por me acalmar quando eu pensava que tudo estava desmoronando.

Aos colegas de laboratório: LABIN por todas as risadas e desesperos. Em especial ao Manoel Phellipe por toda a ajuda, por todo apoio moral e disponibilidade a ajudar.

Aos meus melhores amigos: Úrsula Holanda, Deyvid Moura que sempre me apoiaram e torceram para ver eu chegar onde estou chegando, muitíssimo obrigada.

Minha Amiga Taynar Jales, que foi um presente que DEUS me deu em Mossoró, obrigada por tudo amiga, você foi essencial.

Ao meu time de futsal e basquete, que foi muito importante para manter minha saúde mental em dia, em especial: Claudia, Beatriz, Lívia, Adriana, Iverson, Jederson, Hallysson, Lucas.

Aos meus colegas de curso, em especial: Walter, Sávio, Rackel, Vinicius, Tallyson, Cleyton, Pedro Henrique, Maíra Joyce, Dani.

As companheiras de apartamento: Gabi, Thay, Pamela, Kenia e Andrea que aguentaram a minha fase de viradas de noites exaustivas e cuidavam de mim.

Ao Zacarias Ribeiro Junior pela oportunidade de estágio e confiança no meu trabalho no Laboratório Quarentenário Vegetal da Syngenta.

Ao Jefferson Nunes e Aline Nascimento que conheci na Estação de Quarentena Vegetal, você são maravilhosos.

Aos professores Taffarel Torres, Ioná Santos, Ana Carla, eu tenho profunda admiração, vocês são meus exemplos.

Aos professores Dr. Rui Sales Junior e Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto, por aceitarem o convite para participar da banca.

## RESUMO

O melão (*Cucumis melo*) é uma olerácea de grande importância econômica no Nordeste, pois representa 95% da produção no território nacional. Um dos elementos químicos que influenciam diretamente na produtividade do melão é o nitrogênio. Por ser um gás quimicamente inerte, poucos organismos conseguem fixá-lo na sua forma livre, onde alguns obtêm através da alimentação e outros por meio da quebra da ligação tripla, seja por meio de descargas elétricas, processos industriais ou fixação biológica. Esta última, realizada por bactérias, sejam de vida livre ou simbiotes. Tais bactérias promovem a assistência na recuperação de solos degradados, redução da contaminação de água e solo e redução significativa no custo da produção. Logo, o objetivo deste trabalho foi isolar as bactérias capazes de fixar nitrogênio provenientes da rizosfera do melão. A coleta foi realizada em uma fazenda na cidade de Aracati-CE, onde 5 g da amostra de solo da rizosfera do melão foram adicionadas em 25 mL de água destilada e centrifugadas a 4.000 rpm, em seguida foi retirado 10 µL do sobrenadante que foram adicionados com auxílio da alça de Drigalski a dois diferentes meios: Nyda e Meio Nutritivo (MN) preparados em placas de Petri. Posteriormente as placas foram incubadas em durante 48h a 28-30°C. As colônias isoladas foram cultivadas em Meio Livre de Nitrogênio (MLN) para a seleção e verificação da ação de fixação de nitrogênio durante 10 dias. O resultado apresentado é de caráter qualitativo, onde das 62 linhagens obtidas e testadas, 40 indicaram positividade para fixação de nitrogênio de acordo com seu crescimento em (MLN). Realizado o teste de redução de nitrato, o teste constatou que 32,5% das linhagens fazem redução, 2,5% das linhagens reduzem de nitrato para nitrito e 65% das linhagens reduziram a outros compostos. O teste tintorial apresentou 72,5% de bactérias Gram-negativas e 27,5 % de bactérias Gram-positivas. Este resultado demonstrou que as bactérias isoladas apresentam potencialidade para fixar nitrogênio restabelecendo uma alternativa sustentável do uso de fertilizantes.

Palavras-Chave: Melão, Fixação de Nitrogênio, Bactérias de Vida Livre.

## LISTA DE FIGURAS

|               |    |
|---------------|----|
| Figura 1..... | 23 |
| Figura 2..... | 27 |
| Figura 3..... | 27 |
| Figura 4..... | 28 |
| Figura 5..... | 29 |

## LISTA DE TABELA

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Composição do Meio Nyda.....                                                                                              | 19 |
| Figura 2. Composição do Ágar Nutriente.....                                                                                         | 19 |
| Figura 3. Composição do Meio Livre de Nitrogênio.....                                                                               | 19 |
| Figura 4. Detecção de crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas da rizosfera do melão ( <i>Cucumis melo</i> ) ..... | 24 |
| Figura 5. Detecção da redução de nitrato das bactérias fixadoras de nitrogênio.....                                                 | 25 |
| Figura 6. Coloração de GRAM realizada em bactérias fixadoras de nitrogênio.....                                                     | 28 |

## SUMÁRIO

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                     | <b>11</b> |
| <b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA .....</b>          | <b>12</b> |
| 2.1. Melão ( <i>Cucumis melo</i> ) .....       | 12        |
| 2.3. Bactérias fixadoras de nitrogênio.....    | 14        |
| 2.4. Sistema de fixação de nitrogênio .....    | 15        |
| <b>3. METODOLOGIA.....</b>                     | <b>18</b> |
| 3.1. Coleta das amostras .....                 | 18        |
| 3.2. Isolamento .....                          | 18        |
| 3.3. Seleção de bactérias .....                | 18        |
| 3.4. Redução de nitrato.....                   | 20        |
| 3.5. Caracterização morfológica.....           | 20        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCURSÃO .....</b>         | <b>21</b> |
| 4.2. Seleção de bactérias .....                | 22        |
| 4.3. Redução de nitrato .....                  | 24        |
| 4.4. Teste morfológico da parede celular ..... | 27        |
| <b>5. CONCLUSÃO .....</b>                      | <b>31</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>      | <b>32</b> |

## 1. Introdução

A região Nordeste destacou-se a ser um polo para cultivos comerciais, sendo responsável por 95% da produção nacional de frutos de exportação, tendo como principais produtores, os Estados do Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (ARAUJO & VILELA,2003; IBGE,2006).

Dentre as frutas, o melão (*Cucumis melo*) é uma oleácea rica em sais minerais e vitamina que pode ser consumido na forma de suco ou *in natura*. Destaca-se na região Nordeste devido às excepcionais condições climáticas e abundância solar durante o ano todo e tem o nitrogênio como um dos principais responsáveis pelo sucesso da produção (BHELLA & WILCOX, 1986).

O nitrogênio (N) desempenha papel importante na interação com estruturas genéticas e com a matéria orgânica (MARTINS et.al, 2003). O destaque deste nutriente é relevante devido ao fato de que a cultura do melão faz uso de doses de fertilizantes nitrogenados de forma excessiva, deixando os custos de produção mais dispendiosos, por ser um dos nutrientes mais caros (PRADO JUNIOR,2008). Além disso, acarreta num dano ao meio ambiente devido a poluição dos corpos d'água, devido às perdas por lixiviação (TROEH; THOMPSON, 2007). O nitrogênio é levado às plantas mediante o processo de fixação realizada tanto por bactérias simbiotes, como de vida livre. Para induzir uma absorção mais eficiente de nitrogênio por parte dos cultivos, propõe-se o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, com vistas a reduzir a dependência e o mal uso de insumos sintéticos como o nitrogênio. Dessa forma, para garantir uma melhor eficiência no processo de absorção de nutrientes é de suma importância que as bactérias utilizadas apresentem-se adaptadas ao ambiente em que serão utilizadas.

Assim o presente trabalho foi realizado em áreas de melão (*Cucumis melo*), de onde se coletaram as rizosferas dessa espécie botânica, no intuito de isolar e selecionar bactérias fixadoras de nitrogênio.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Melão (*Cucumis melo*)

O melão (*Cucumis melo*) é originário da África tropical e difundiu-se para Europa e Ásia e os demais continentes (BURGER et al., 2009). Nas américas a entrada foi através de Cristóvão Colombo, onde o fruto passou a ser utilizado pelos índios sendo assim disseminado de forma rápida por todo o continente (Costa & Pinto, 1977). A introdução da cultura do meloeiro no Brasil ocorreu em meados de 1960 pelos imigrantes europeus na região sul e sudeste do país, dispersando assim a cultura pelo território e apresentando expressão econômica no nordeste na década de 1980 (QUEIRÓZ, 2011).

O fruto é uma olerácea classificada como uma dicotiledônea e pertence à família *Cucurbitaceae*. Este fruto apresenta uma grande importância socioeconômica para o nordeste, já que é a principal região dos meloeiros do território nacional (FREITAS et al., 2014), participando de 95% da produção (SOUSA et al., 2012; DANTAS et al., 2013). O Brasil é o 3º maior produtor do cultivar no mundo e os principais estados produtores são Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco. Segundo Agrianual (2013), o melão está entre as três principais frutas exportadas pelo Brasil e no ranking de produção encontra-se em oitavo lugar.

O cultivo deste fruto na região nordeste, se dá pelas excepcionais condições climáticas, pela baixa umidade do ar, das altas temperaturas e da grande incidência solar predominante grande parte do ano (COSTA, 2012). Em 2015, o melão foi destaque como a fruta de maior volume exportado alcançando 223 mil toneladas com valor de safra avaliado em US\$ 142 milhões (HORTIFRUTI/CEPEA, 2016).

De acordo com Negreiros et al., (2013), Santos e Pinheiro Neto (2004), caso as condições estejam favoráveis para o desenvolvimento do fruto, as mesmas vão garantir um número reduzido de doenças e pragas e aumentar a qualidade e produtividade do melão em um ciclo de vida bem mais curto (COSTA, 2012).

O melão tem preferência por solos que tenham riqueza em matéria orgânica, boa estruturação, aeração e um sistema ideal de drenagem (SOUSA et al., 1999), pois esses critérios favorecem o crescimento radicular e a melhor infiltração da água por suas raízes. Essas características do solo fazem com que a planta tenha um excelente desenvolvimento e uma maior produtividade, mantendo as características importantes para processo de pós-colheita e importação, como, maior concentração de açúcar, polpa e uma melhor conservação do fruto (ANGELOTTI e COSTA, 2010).

A disponibilidade de água em excesso pode levar a uma qualidade ruim do fruto, já se ocorrer um estresse hídrico a produção irá diminuir (ZENG et al., 2009). Um dos elementos químicos de grande importância na produção, é o nitrogênio. O mesmo interfere diretamente na nutrição, coloração, formato de fruto e consistência da polpa (BHELLA & WILCOX, 1986).

## **2.2. Ciclo do nitrogênio**

O nitrogênio (N) é o mais abundante de todos os elementos dos ciclos biogeoquímicos, representando aproximadamente 78% do ar atmosférico. Foi descoberto no ano de 1772 por Daniel Rutherford. Embora paralelamente outros três químicos realizaram a mesma descoberta, na Grã Bretanha, com os químicos Joseph Priestley e Henry Cavendish e na Suécia com Carl Wilhelm Scheele. Seu nome científico foi dado por Jean Antoine Claude Chaptal no ano de 1790, quando o mesmo percebeu que o nitrogênio era um dos componentes formadores do ácido nítrico e dos nitratos (LEE,2001; GREENWOOD,1984; PEIXOTO,1997).

Esse elemento tem o poder de realizar interações importantes com matérias orgânicas, compostos inorgânicos, participando também, na estruturação de informações genéticas, moléculas importantes para o metabolismo como o ATP (MARTINS et.al, 2003). Entretanto, poucos são os organismos que conseguem utilizá-lo na sua forma livre, pois o nitrogênio do ar é quimicamente inerte.

Para que seres humanos e animais tenham acesso a esse gás, a única fonte de obtenção é o alimento, de acordo com Cardoso & Santos (2013). Para os outros seres é necessário que ocorra a quebra da ligação tripla para a

produção de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e amônia ( $\text{NH}_3$ ), seja ela por processos industriais, descargas elétricas ou pela fixação biológica realizada por bactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Depois do processo de fotossíntese, a realização de fixação de nitrogênio é mais o importante processo para a planta (HORTIFRUTI, 2016). De forma geral, qualquer alteração nos níveis de nitrogênio no solo pode interferir, com um certo impacto, na vida nos microrganismos, plantas e animais (MOLINS-LEGUA et al., 2006)

A circulação do nitrogênio é realizada por organismos vivos, onde fazem a fixação desses nutrientes em solo, planta e seres vivos. Para que o nitrogênio seja absorvido e introduzido no ciclo biogeoquímico, é necessário que passe, primeiramente, pelo processo de lixiviação. Para o processo de fixação, este elemento percorre mais três etapas, sendo estas a amonificação, nitrificação e desnitrificação.

A etapa de amonificação ou mineralização, segundo Cordeiro (2004) é o processo pelo qual fungos e bactérias realizam a decomposição de compostos nitrogenados da matéria orgânica presente no solo, transformando-a, por exemplo, em amônia ( $\text{NH}_3$ ). Já o processo de nitrificação, segundo WINOGRADSKY (1890), é a sequência do processo de mineralização, onde ocorre a oxidação da amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), tendo como substância intermediária o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (BREMNER, 1997). Esse processo é realizado por bactérias quimioautotróficas que obtêm energia no processo, chegando a sintetizar os seus constituintes celulares a partir do  $\text{CO}_2$  (CANTARELLA, 2007).

Já a desnitrificação é o processo de retorno do nitrogênio para a atmosfera que é realizado por algumas bactérias anaeróbias facultativas, exemplificando, a *Pseudomonas denitrificans* na ausência de oxigênio, utilizando como receptores de elétrons os óxidos de N, seja o  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$ .

### **2.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio**

A ação de simbiose é uma interação entre dois ou mais organismos diferentes que traz um benefício para ambos. A associação simbiótica é realizada por microrganismos que ajudam na fixação do nitrogênio para melhorar a produtividade do cultivo (HUNGRIA et al., 2000). No ano de 1886, os pesquisadores Hellriegel e Wilfarth afirmaram que os microrganismos

presentes nos nódulos das leguminosas utilizavam o nitrogênio na sua forma gasosa.

Dentre esses microrganismos, temos bactérias que realizam simbiose com as plantas, destacando como as mais encontradas as do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Photorhizobium*, *Sinorhizobium* (TAIZ & ZEIGER, 2004). As bactérias que se associam simbioticamente são conhecidas como rizóbios, classificados como bactérias gram-negativas, aeróbias obrigatórias e alfa-proteobactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Já nas bactérias de vida livre que realizam o processo de fixação de nitrogênio, os primeiros gêneros encontrados foram *Azotobacter* e *Clostridium*. Essas bactérias desempenham um papel no solo tão eficiente quanto as bactérias que realizam simbiose, devido ao fato de conseguirem desfrutar diferentes fontes de carbono para usar em seu metabolismo (REIS, 2011). Estes procariotos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, podendo ser organotróficos e desempenhar um metabolismo variado em relação ao oxigênio, sendo classificadas de acordo com suas necessidades em grupos distintos como: bactérias anaeróbias, aeróbias e facultativas. No grupo dos anaeróbios temos *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Metanobactérias*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., entre outras. No grupo das aeróbias temos *Azotobacter* spp., *Beijerinckia*, *Dexia* spp., e nos facultativos encontramos as bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Bacillus*, *Azospirillum*. Já as bactérias fotossintéticas de vida livre temos como exemplos, as cianobactérias, bactérias púrpuras como *Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Thiocapsa*, entre outras.

#### **2.4. Sistema de fixação de nitrogênio**

A fixação de nitrogênio é realizada pela enzima nitrogenase, onde as bactérias realizam a quebra da ligação tripla no nitrogênio atmosférico transformando-o em amônia transferindo-o para a planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A utilização dessas bactérias fixadoras de nitrogênio, ajuda no processo de recuperação de solos degradados, exemplificando a recuperação de solo férteis, perda de matéria orgânica e fertilidade do solo ocasionados pelo uso de máquinas agrícolas, utilização de fertilizantes,

fungicidas e herbicidas. Atua no aumento da produtividade da cultura, redução da contaminação do solo e água, reduzindo assim o custo de produção (FRANCO; FARIA, 1997). No processo de degradação, após a remoção de solo da superfície, a matéria orgânica ali presente pode causar problemas na quantidade de água disponível, na estruturação do solo e, principalmente, na atividade biológica, restringindo a planta aos nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (FRANCO et al., 1995). De acordo com Peoples & Crasweel (1992), a fixação biológica de nitrogênio anual é estimada em uma variável de 139 a 170 x 10<sup>6</sup> de toneladas por ano, o que é equiparável ao dobro da fixação química.

A nitrogenase é a enzima que tem maior importância no processo de fixação de nitrogênio (SUR et al, 2010). Essa enzima é composta por duas proteínas: a proteína dinitrogenase redutase, que apresenta ferro na sua composição, e a dinitrogenase, que apresenta em sua composição além de ferro, também o molibdênio (DEAN; JACOBSEN, 1992; HOWARD: REES, 1996; DIXON; KAHN, 2004). Estes compostos são muito sensíveis ao oxigênio, por causa de seus grupos metálicos expostos ao solvente. Para cada molécula de N<sub>2</sub> fixada, a nitrogenase hidrolisa 16 moléculas de ATP (POSTGATE,1982). Encontra-se organizada no plasmídeo ou no cromossomo, variando de acordo com a espécie bacteriana em estudo e dispõe do gene conhecido como *nif* ou fixadores de nitrogênio, o mesmo é responsável pela codificação das proteínas que estão envolvidas na redução do N (SPRENT, 2001).

O primeiro organismo na qual foi encontrada a organização desse gene foi a *Klebsiella pneumoniae* (ARNOLD et al.,1988 *apud* SUR, 2010). Além dos genes *nif*, nas bactérias que tem capacidade de fazer mutualismo com plantas, tem sido observado genes, tais como, o *fix* e o *nod* que codificam proteínas que indiretamente desempenham função essencial na nodulação. Os genes *fix* ajudam a identificar genes essenciais para a fixação de nitrogênio, que não tenha cópias idênticas aos genes de *K. pneumoniae* (FISCHER,1994). O gene *nod* é responsável pela liberação de síntese enzimática que realiza a formação do nódulo (BREWIN,1991; LONG,1996). A expressão destes genes bacterianos é regulada pela ação de isoflavonóides (KOSSLAK et al., 1987; PERRET et al., 2000).

O processo de absorção e assimilação de nitrogênio pela planta ocorre tanto pelas folhas, como pelas raízes, dependendo da forma de nitrogênio que lhe é apresentada, seja ela nitrato ou amônio (STITT et al., 2002). A absorção sofre ação da disponibilidade energética para realização do transporte de íons pelas membranas da planta. O nitrato, após efetuar sua entrada nas células das raízes, pode vir a ser reduzido pela enzima redutase de nitrato em nitrito na região do citosol e no plastídio. Posteriormente, o nitrito é convertido pela enzima redutase de nitrito em amônio, adicionando o nitrogênio aos aminoácidos por duas enzimas: a glutamato sintase e glutamina sintase, resultando na formação de glutamina, glutamato e alguns aminoácidos (ARAGÃO et al., 2010). O mecanismo de assimilação pela folha é semelhante, porém existe uma via alternativa que armazena o nitrato por meio de carreadores específicos no vacúolo para em seguida vir a ser reduzido no citosol (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Coletas das amostras da rizosfera do melão**

Foram realizadas 3 coletas em 3 meses diferentes, sendo a primeira coleta realizada no dia 25 de Janeiro, a segunda realizada no dia 04 de março e a terceira coleta realizada no dia 05 de abril de 2016. As amostras foram adquiridas de uma fazenda de melão na comunidade de Cacimba funda da cidade de Aracati-CE (Latitude 4°33'5" S/Longitude 37°48'12" W).

Todas as amostras procederam-se com o auxílio de estilete para realizar a separação da rizosfera do caule. O material adquirido foi armazenado em sacos plásticos e acondicionados em isopor com gelo para realizar o transporte até o laboratório de Biorreatores, Nanobiotechnologia e Inovação (LABIN).

#### **3.2 Isolamento**

O processo de isolamento de rizobactérias consistiu em desinfestar superficialmente as raízes, por meio da imersão em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 1 minutos, seguindo-se de 1 minuto em água destilada. Esta metodologia de desinfecção elimina eficientemente os fungos contaminantes enquanto mantém altos níveis de bactérias (WILKINSON et al., 1989).

Para o isolamento de bactérias rizosfericas, as raízes foram colocadas em um almofariz autoclavado e o tecido radicular macerado em com água destilada, onde 5 g foi colocado em tubo falcon e adicionado 25 mL de água destilada para centrifugação a 4000 rpm, 25 °C por 10 minutos. Uma alíquota (100 µL) de cada diluição foi transferida para os meios Nyda (Tabela 1) e ágar nutriente (tabela 2) com o auxílio da alça de Drigalsky.

Posteriormente, foi feito o esgotamento para fazer o isolamento de colônias, nos respectivos meios de isolamento.

**TABELA 1.** Composição de meio Nyda

| Reagentes           | Quantidade |
|---------------------|------------|
| Glicose             | 10g/L      |
| Extrato de Levedura | 5 g/L      |
| Ágar nutriente      | 23 g/L     |
| Água destilada      | 1.000mL    |

**Fonte: Arquivo Pessoal (2016).**

**TABELA 2.** Composição de meio Nutriente

| Reagentes        | Quantidade |
|------------------|------------|
| Peptona          | 5g/L       |
| Extrato de carne | 3 g/L      |
| Ágar nutriente   | 15 g/L     |
| Água destilada   | 1.000mL    |

**Fonte: Arquivo Pessoal (2016).**

Depois de preparados, ambos meios tiveram pH ajustado para 6,8 e 7,2, respectivamente (com HCl 1 N ou KOH 1 N) e foram autoclavados (a 121 °C, 1 Kg.cm<sup>-2</sup>) durante 15 minutos.

### 3.3 Seleção de bactérias

A seleção bacteriana foi feita em meio sólido livre de nitrogênio (MLN) (TABELA 3), sem a presença de extrato de levedura, meio adaptado por Rennie (1981). Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de MLN e incubados a 28 -30 °C, por 10 dias.

**TABELA3.** Composição de meio livre de nitrogênio

| Reagentes                    | Quantidade |
|------------------------------|------------|
| Sacarose                     | 5,0 g/L    |
| Manitol                      | 5,0 g/L    |
| Lactato de sódio             | 0,5 mL     |
| Fosfato de potássio dibásico | 0,80 g/L   |

|                                                                      |             |
|----------------------------------------------------------------------|-------------|
| Fosfato de potássio monobásico                                       | 0,20 g/L    |
| Sulfato de magnésio                                                  | 0,20 g/L    |
| Cloreto de cálcio                                                    | 0,06 g/L    |
| Cloreto de sódio                                                     | 0,10 g/L    |
| Molibdato de sódio                                                   | 0,002 g/L   |
| Sulfato de zinco                                                     | 0,00024 g/L |
| Sulfato de cobre                                                     | 0,0004 g/L  |
| Sulfato de cobalto                                                   | 0,01 g/L    |
| Sulfato de manganês                                                  | 0,003 g/L   |
| Etilenodiaminotetracético sódico-<br>férico (Na <sub>2</sub> FeEDTA) | 0,028 g/L   |
| Ácido Bórico                                                         | 0,005 g/L   |
| Biotina                                                              | 0,005 g/L   |
| Ácido p-aminobenzóico                                                | 0,01 g/L    |
| Agar bacteriológico                                                  | 15g/L       |
| Água destilada                                                       | 1.000mL     |

Fonte: Arquivo Pessoal (2016).

### 3.4 Redução de Nitrato

Para a realização das análises de redução de nitrato, as bactérias foram cultivadas em 0,5 mL de caldo nitrato em tubo de ensaio a 28-30 °C, por 24 horas. Após o tempo de cultivo foram adicionados 10 µL do reagente A (N-N-Dimetil-α-Naftalamina) e 10 µL do reagente B (Ácido Sulfanílico 0,8%). Os tubos foram agitados e considerou-se resultado positivo os tubos que apresentaram coloração vermelha. Nos tubos com resultado negativo, foi adicionado zinco metálico e o desenvolvimento da coloração vermelha confirmava a presença de nitrato. Nos tubos que permaneceram com a cor inalterada, confirmava a redução de nitrato em outros produtos voláteis, confirmando um resultado positivo.

### **3.5 Coloração de Gram**

A coloração de Gram foi realizada com os 40 isolados, anteriormente citados. Em lâminas foram feitos os esfregaços individuais de cada amostra, estas foram coradas através da adição de cristal violeta por 60 segundos e em seguida lavou-se as lâminas com água destilada. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com Lugol, por um período de 60 segundos lavando-se com água destilada. As lâminas foram então descoradas com etanol-acetona 1:1 (v:v) até eliminação da coloração (por 20 segundos aproximadamente) e novamente lavou-se com água destilada. E por fim, adicionou-se safranina por 60 segundos com nova lavagem das lâminas em água destilada (BRASIL, Ministério da Saúde, 2001). Após a secagem das lâminas observou-se a morfologia das colônias em um microscópio óptico utilizando aumento de 40 e 100x. (Tabela 6).

## **4.Resultados e Discussão**

### **4.1 Coletas das amostras e isolamento primário**

A metodologia empregada na coleta foi satisfatória para a seleção primária dos materiais que originaram os isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir da rizosfera da planta. Segundo Wilkinson et al., 1989, essa metodologia adotada elimina eficientemente os fungos contaminantes enquanto mantém os altos níveis de bactérias.

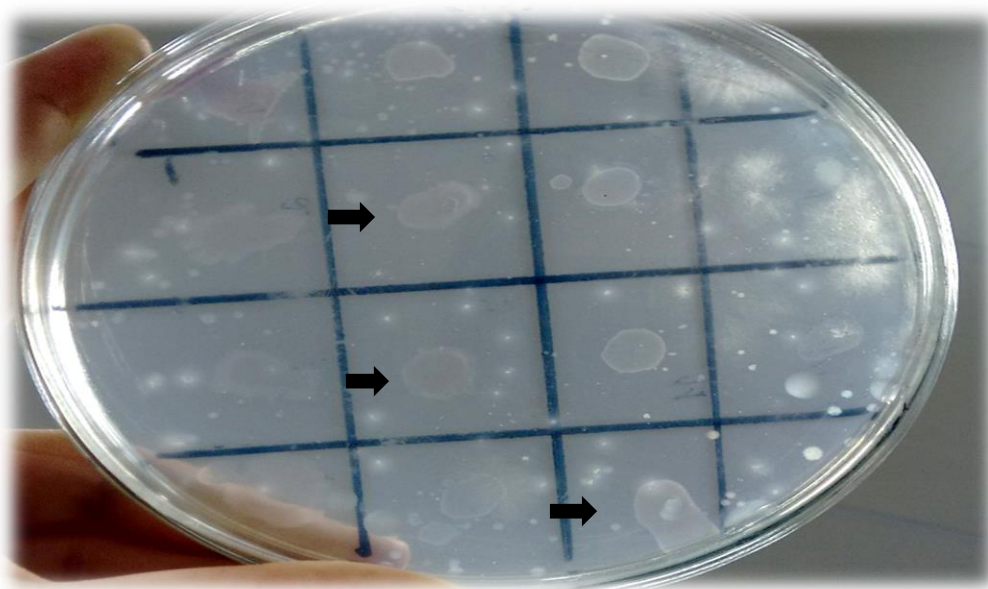
O meio Nyda e o Meio nutriente utilizados na etapa inicial do isolamento possibilitou a obtenção de 62 linhagens. Os resultados encontrados nessa pesquisa são semelhantes aos resultados encontrados por Pais et al., 2016, onde para a obtenção de seus isolados no Meio Nyda, conseguiu realizar o isolamento de 44 bactérias em uma proporção de 1:2 (rizosfera e água destilada) na cultura da melancia (*Citrullus lanatus*), enquanto na cultura do melão a proporção foi de 1:5 (rizosfera e água destilada), resultando assim numa metodologia alternativa, pois conseguiu-se mais isolados de bactérias em uma forma menos concentrada.

A utilização dos meios semi-seletivos, Nyda e Ágar Nutriente utilizados nessa pesquisa é vantajoso para o isolamento de bactérias provenientes da rizosfera e do solo, alguns conseguem até ser tão significativo quanto uma reação em cadeia da polimerase (PCR) (WANG et al., 1999), porém a colonização da microbiota sofre inúmeras interferências devido a diversos fatores bióticos e abióticos, nutrientes inorgânicos, temperatura, pH e o tipo de solo (BAIS et al., 2004; KAMILOVA et al., 2006; SOLANO et al., 2008).

Os meios semi-seletivos utilizados apesar de não serem indicados para realizar os isolamentos de bactérias diazotróficos apresentaram um crescimento bacteriano rápido possibilitando uma pré-seleção dirigida, resultando um resultado satisfatório. Segundo Amann et al., 1990, os meios de cultura não fazem a representação real da quantidade de microrganismos existente no meio ambiente, já que somente 1% deles pode ser cultivado pelos métodos tradicionais em laboratório. Entretanto, apesar dessa limitação, os mesmos não deixam de fornecer informações sobre a comunidade microbiana presente no solo.

## 4.2 Seleção de bactérias

O método de seleção das bactérias fixadoras de nitrogênio foi avaliado mediante a utilização do MLN, meio este que garante o crescimento de microrganismos com exigências variadas (RENNIE,1981). A seleção utilizou as 62 linhagens provenientes do isolamento primário, onde obteve um resultado confirmatório da capacidade de fixação biológica de nitrogênio através do crescimento de 40 linhagens, (FIGURA 1) as mesmas tiveram que desenvolver o mecanismo de fixação de  $N_2$  atmosférico para suprir as suas exigências. Isso representa 64,51% do total das bactérias isolada (TABELA 4). Apesar do crescimento das bactérias no MLN ter sido considerado um bom indicador da capacidade de fixação de nitrogênio, é necessário a realização de testes mais específicos com o intuito de confirmar de fato um potencial fornecimento de nitrogênio a partir do isolado. De acordo com Siqueira et al. 1999, o processo de fixação de nitrogênio em potencial, depende fortemente da interação das bactérias com a planta, dos fatores bióticos e abióticos e da competitividade com o restante da microbiota que está presente no local de coleta.



**FIGURA 1.** Crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio (seta) em meio livre de nitrogênio.

**TABELA 4.** Detecção de crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas da rizosfera do melão (*Cucumis melo*) em meio MLN

| <b>Isolado</b> | <b>Crescimento</b> | <b>Isolado</b> | <b>Crescimento</b> |
|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| SB01           | -                  | SB32           | +                  |
| SB02           | +                  | SB33           | +                  |
| SB03           | -                  | SB34           | +                  |
| SB04           | +                  | SB35           | +                  |
| SB05           | -                  | SB36           | +                  |
| SB06           | -                  | SB37           | -                  |
| SB07           | -                  | SB38           | +                  |
| SB08           | +                  | SB39           | +                  |
| SB09           | +                  | SB40           | -                  |
| SB10           | +                  | SB41           | +                  |
| SB11           | +                  | SB42           | -                  |
| SB12           | -                  | SB43           | +                  |
| SB13           | +                  | SB44           | -                  |
| SB14           | +                  | SB45           | -                  |
| SB15           | -                  | SB46           | +                  |
| SB16           | +                  | SB47           | -                  |
| SB17           | -                  | SB48           | +                  |
| SB18           | +                  | SB49           | -                  |
| SB19           | +                  | SB50           | -                  |
| SB20           | +                  | SB51           | +                  |
| SB21           | +                  | SB52           | +                  |
| SB22           | +                  | SB53           | -                  |
| SB23           | -                  | SB54           | +                  |
| SB24           | +                  | SB55           | +                  |
| SB25           | +                  | SB56           | -                  |
| SB26           | +                  | SB57           | +                  |
| SB27           | +                  | SB58           | +                  |
| SB28           | +                  | SB59           | -                  |
| SB29           | +                  | SB60           | +                  |
| SB30           | +                  | SB61           | +                  |

**Fonte: Arquivo Pessoal (2016).**

+ Capacidade de crescimento em meio MLN

- Incapacidade de crescimento em meio MLN

### 4.3 Redução de nitrato

A determinação da capacidade de redução do nitrato foi verificada pela reação da oxidação do meio de cultura com a adição do reagente A mais o reagente B alterando a coloração do meio (FIGURA 2). A redução do nitrato em caldo de nitrato foi observada em 30,95% dos isolados bacterianos, ou seja, os isolados apresentam a enzima redutase de nitrato. Estudos realizados por Harish et al., 2008, exibiu também a presença da enzima redutase de nitrato em seus isolados testados em bananeiras. Apenas 2,39 % corresponde ao total dos meios que após a adição de zinco metálico teve alteração de cor, exibindo a redução de nitrato para nitrito (TABELA 5). Os 66,66% dos isolados bacterianos restantes mesmo com a adição de zinco metálico não dispôs de alteração de cor, confirmando a redução de nitrato em outros produtos voláteis como óxido nitroso ou  $N_2$  (FIGURA 3), o que também não isenta a capacidade de serem uma alternativa promissora como um bioinoculante, já que devido o nitrato ser fracamente ligado a matéria orgânica e possuir íons com solubilidade elevada, podem levar à contaminação de corpo hídricos devido à lixiviação ocasionada pelas águas das chuvas (MEURER, 2004).

**TABELA 5.** Detecção da redução de nitrato das bactérias fixadoras de nitrogênio

| Isolado | A+B | Zn | Isolado | A+B | Zn |
|---------|-----|----|---------|-----|----|
| SB02    | +   | -  | SB30    | +   | -  |
| SB04    | +   | -  | SB32    | +   | -  |
| SB08    | +   | -  | SB33    | -   | -  |
| SB09    | +   | -  | SB34    | -   | -  |
| SB10    | -   | -  | SB35    | -   | -  |

|      |   |   |      |   |   |
|------|---|---|------|---|---|
| SB11 | + | - | SB36 | - | - |
| SB13 | + | - | SB38 | - | - |
| SB14 | + | - | SB39 | - | - |
| SB16 | + | - | SB41 | - | - |
| SB18 | - | - | SB43 | - | - |
| SB19 | + | - | SB46 | - | - |
| SB20 | + | - | SB48 | - | - |
| SB21 | - | - | SB51 | - | - |
| SB22 | - | - | SB52 | - | - |
| SB24 | - | - | SB54 | - | - |
| SB25 | - | - | SB55 | - | - |
| SB26 | - | - | SB57 | - | - |
| SB27 | - | - | SB58 | - | - |
| SB28 | - | - | SB60 | - | × |
| SB29 | - | - | SB61 | - | - |

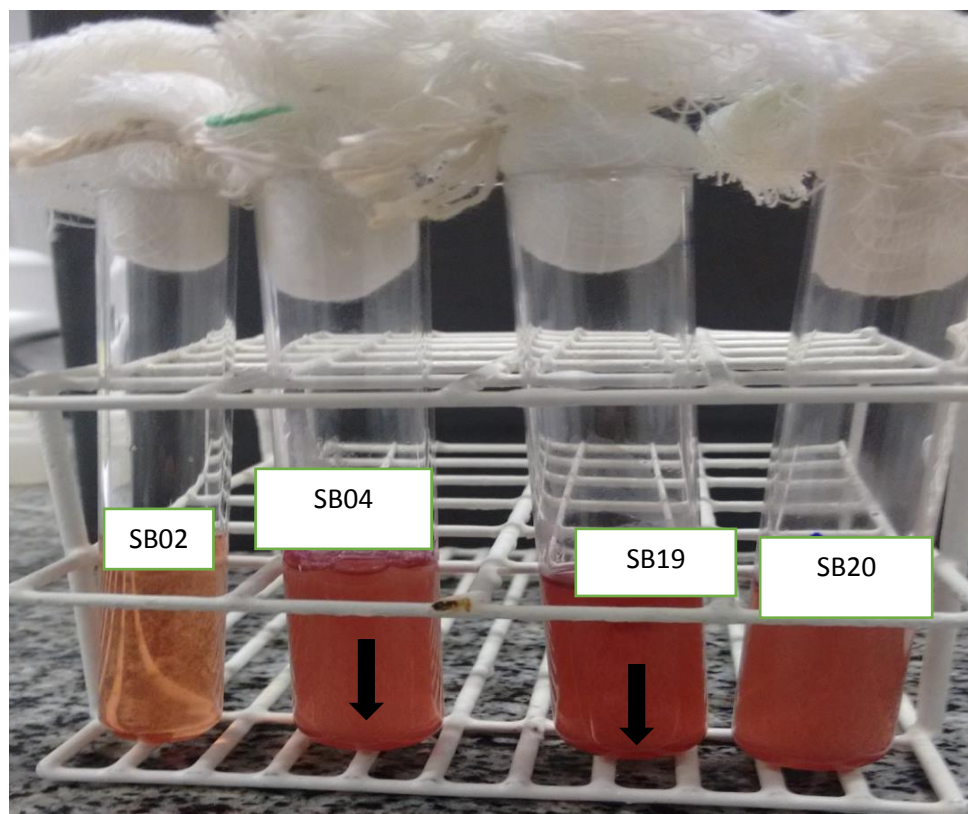
---

**Fonte: Arquivo Pessoal (2016).**

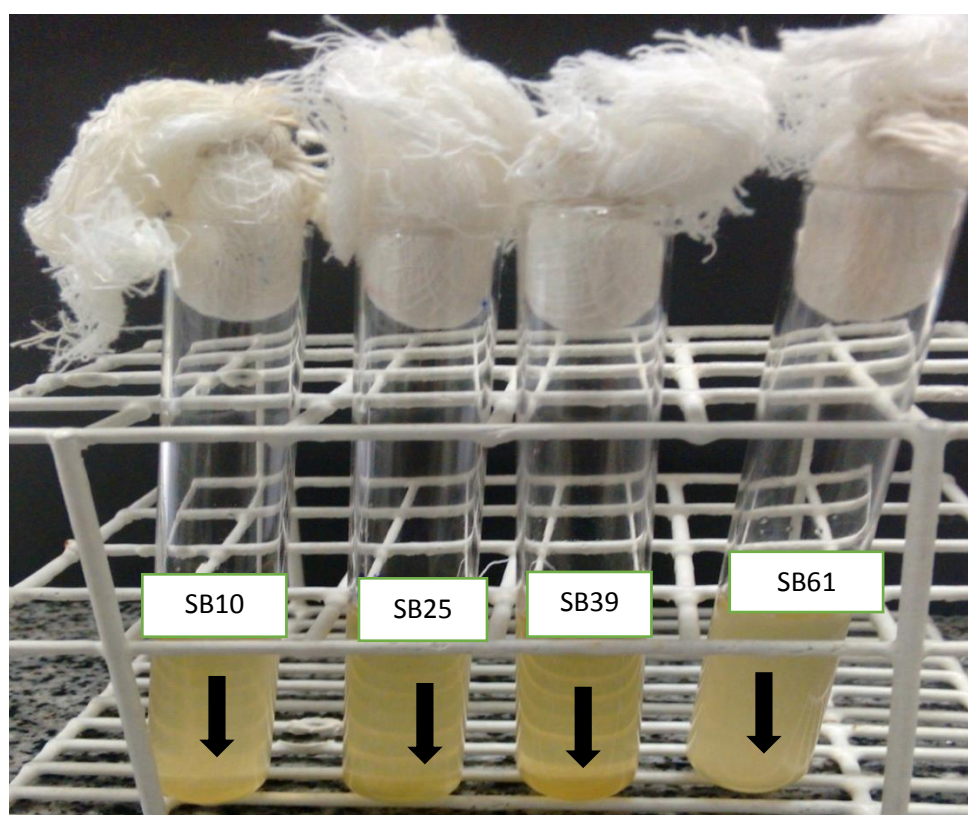
+ Redução para nitrato

- Sem alteração de cor

× Redução de nitrato para nitrito



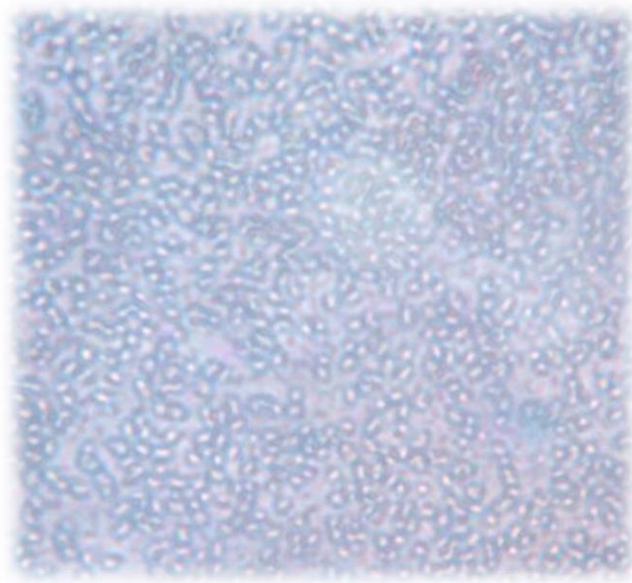
**FIGURA 2.** Teste de redução de nitrato de bactérias fixadoras de nitrogênio (seta) em caldo nitrato com alteração de coloração.



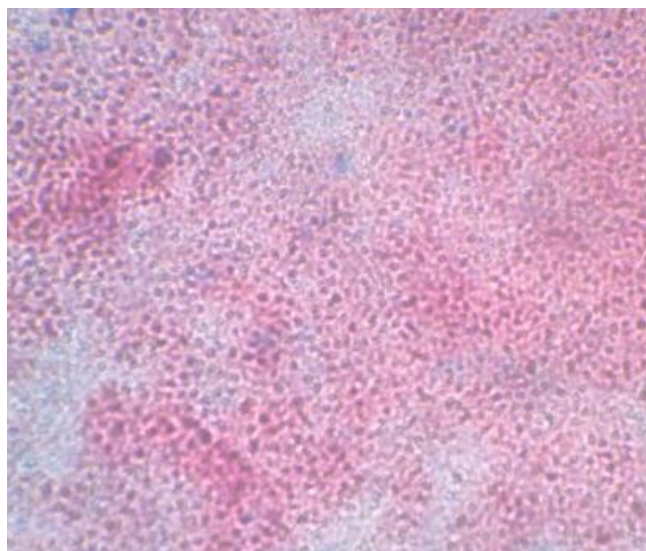
**FIGURA 3.** Teste de redução de nitrato de bactérias fixadoras de nitrogênio (seta) em caldo nitrato sem alteração da coloração após adição de zinco metálico.

#### 4.4 Teste morfológico da parede celular

O teste morfológico da parede celular realizado nos 40 isolados (TABELA 6) das bactérias fixadoras de nitrogênio, apontou como resultado que 72,5% das bactérias são Gram-negativas (FIGURA 4) e 27,5% são Gram-positivas (FIGURA 5). Estudos realizados com Silva e Nahas (2002) em feijão, apresentaram 5,3% de bactérias Gram-negativas e 76,3 % de bactérias Gram-positivas. Entretanto, em um estudo realizado com trigo por Rouatt e Katznelson, apresentou mais bactérias Gram-negativas do que Gram positiva.



**FIGURA 4.** Bactéria Gram-Positiva.



**FIGURA 5.** Bactéria Gram-Negativa.

**TABELA 6.** Coloração de GRAM realizada em bactérias fixadoras de nitrogênio

| Isolado | GRAM | Isolado | GRAM |
|---------|------|---------|------|
| SB02    | +    | SB30    | -    |
| SB04    | -    | SB32    | -    |
| SB08    | -    | SB33    | +    |
| SB09    | -    | SB34    | +    |
| SB10    | -    | SB35    | +    |
| SB11    | +    | SB36    | +    |
| SB13    | -    | SB38    | -    |
| SB14    | -    | SB39    | -    |
| SB16    | +    | SB41    | +    |
| SB18    | -    | SB43    | +    |
| SB19    | -    | SB46    | +    |
| SB20    | -    | SB48    | -    |
| SB21    | -    | SB51    | -    |
| SB22    | -    | SB52    | -    |
| SB24    | -    | SB54    | -    |

|      |   |      |   |
|------|---|------|---|
| SB25 | - | SB55 | - |
| SB26 | - | SB57 | + |
| SB27 | - | SB58 | - |
| SB28 | - | SB60 | - |
| SB29 | - | SB61 | - |

---

**Fonte: Arquivo Pessoal (2016).**

## **5. CONCLUSÃO**

Este estudo constata que 40 isolados de um total de 62 provenientes da rizosfera do melão fixam nitrogênio, devido o potencial do semiárido é preciso realizar experimentos mais aprofundados que poderão indicar melhores linhagens para a fixação de nitrogênio em melão. E acordo com os testes morfológicos da parede celular, 72,5 % são bactérias Gram negativas.

Portanto, esse trabalho revelou que de acordo com a sua potencial capacidade de fixar nitrogênio, serve para o uso agrícola como bioinoculante.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, p.313- 360, 2013.

ANGELOTTI, F.; COSTA, N. D. Sistema de produção de melão. **Embrapa Semi-árido**. 2010. Disponível em: <  
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/socioeconomia.html>> Acesso em: 14 jun. 2016.

ARAGÃO, R.; SILVEIRA, J.; SILVA, E.; LOBOS, A.; DUTRA, A. Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupis submetido à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 1, p. 100-106, 2010.

ARAÚJO JLP; VILELA NJ. *Aspectos econômicos*. In: SILVA HR; COSTA ND. Melão Produção: aspectos técnicos. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 15-18, 2003.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of a 24206 base pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Mol. Biol.**, Londres, v.230, p. 714-738, 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília, p. 1-67, 2001.

BHELLA, M.; WILCOX, G.E. Yield and composition of muskmelons as influenced by preplanting and trickle applied nitrogen. **Hortscience**, v.21, n.1, p.86-88. 1986.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.; Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**. v.30, n.2, p. 365-372, 2000.

BREMNER, J.M. Sources of nitrous oxide in soils. **Nutr. Cycl. Agroecosyst**, v.49; p.7-16, 1997.

BREWIN, N.J. Development of the legume root nodule. **Annu. Rev. Cell Biol.** v. 7, p.191- 226, 1991.

BURGER, Yosef et al. Genetic diversity of *Cucumis melo*. **Hortic Rev**, v. 36, p. 165-198, 2009.

CARDOSO, G. G. A. A.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: Um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, Vol. 36, No. 9, 1468-1476, 2013.

CATARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 375-470, 2007.

CORDEIRO, L. Fixação de nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, p.76-93, 2004.

CHUN, J. Computer-Assisted Classification and Identification of Actinomycetes [thesis]. **Newcastle upon Tyne**. Newcastle University, 1995.

COSTA, C. P. PINTO, C.A.B.P. **Melhoramento de Hortaliças**. Piracicaba, SP: ESALQ, p. 164 -175,1977.

COSTA, M.C. Efeito de diferentes lâminas de água com dois níveis de salinidade na cultura do meloeiro.115 f., Tese (Doutorado em Agronomia: Irrigação e drenagem) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 1999.

COSTA, N.D. O cultivo do melão. 2005 Disponível em:<http://www.hortibrasil.org.br/jnw/images/stories/Melao/m.69.pdf>. Acesso em 04 de set. 2015.

COSTA, N.D.; RESENDE, G.M.; YURI, J.E.; PETRERE, V.G.; PINTO, J.M.; FERREIRA, T.S.D. Produtividade e qualidade de frutos de melão em dois métodos de irrigação no Submédio São Francisco. **Horticultura Brasileira**,v.30, p.2605-2611, 2012.

DANTAS, I. C.; OLIVEIRA, C. W.; SILVA, F. L.; SANTOS, F. S. S.; MARCO, C. A. Produção de melão amarelo sob diferentes densidades de plantio. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 7, n. 1, p. 74-84, 2013.

DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R. Biological Nitrogen Fixation, **In Stacey G al**, p. 763–834, 1992.

DE QUEIRÓZ, M.A. Germoplasma de cucurbitáceas no Brasil. **Hortic. bras**, v. 29, n. 2, 2011.

DIXON,R.;KAHN,D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol**, v.2,p.621–631, 2004.

FISCHER, Hans-Martin. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

FRANCO,A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agente de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: FISCHER, E. CARVALHO, L. F. A. V; CUNHA,N.L. da. (Ed.) **Oecologia Brasiliensis: volume 1: estruturas, funcionamento e manejo de**

ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro: **Creative Commons Attribution**, p. 459-467, 1995.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. de. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n.5, p. 897-903, 1997.

FREITAS, L. D. A.; FILGUEIRÊDO, V. B.; PORTO FILHO, F. Q.; COSTA, J. C.; CUNHA, E. M. Crescimento e produção do meloeiro cultivado sob diferentes níveis de salinidade e nitrogênio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, (suplemento), p. 20 - 26, 2014.

GREENWOOD, N.N; Eamshaq, A.; *Chemistry of the Elements* Londres: **Pergamon Press**, p.466-470, 1984.

HARISH, S. et al. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistences against banana bunchy top vírus. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 2, p. 187-200, 2008.

Holding AJ. The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. **J Appl Bacteriol**, v. 23, n.3, p.515-25, 1960.

HORTIFRUTI. Exportação de melão. Disponível em <http://www.hfbrasil.org.br/br>. Acessado 29 de Set.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. **Structural basis of biological nitrogen fixation**. *Chem. Rev.*, v.96, p. 2965–2982, 1996.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. 14 de outubro. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

KOSSLAK, R.M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H.E.; APPELBAUM, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.84, p.7428-7432, 1987.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: **John Wiley and Sons**, p. 115–175, 1991.

LEE, J. D.; *Química Inorgânica não tão concisa*. Ed.5. São Paulo: **Edgard Blucher Ltda**, p. 466-470, 2001.

LONG, S.R. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. **Plant Cell**, v.8, p.1885-1889, 1996.

MARTINS, C. R.; PEREIRA, P. A. P.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Ciclo globais de carbono, nitrogênio e enxofre: **A importância na química da atmosfera**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n. 5, 2003.

MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. 2º Edição, Editora UFRGS, Porto Alegre, 2004.

MOLINS-LEGUA, C.; MESEGUER-LLORET, S.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n.3, p. 282-290, 2006.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating Bacteria. In: **Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems**. Moreira, F.M.S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L. Eds. CABI Publishing, p. 237-270, 2006.

(MOREIRA, F. N. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ed. 2. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MONTEIRO, R. O. C. Influência do gotejamento subterrâneo e do “mulching” plástico na cultura do melão em ambiente protegido. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2007.

NEGREIROS, M.Z.; COSTA, F.A.; MEDEIROS, J.F.; BEZERRA NETO, F.; LEITÃO, M.M.; PORTO, V.B.R.; GONDIM, D.R.Q.; OLIVEIRA, A.R.; SALDANHA, T.R.F.C. Cobertura do solo e lâminas de irrigação no rendimento do melão 'Gold Mine' cultivado no período chuvosos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. Anais**. Recife: Horticultura Brasileira, 2003.

PEIXOTO, E. M. A. Elemento químico – Nitrogênio. **Química Nova Escola**. N.6, p.34, 1997.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

PERRET, X; STAEHELIN, C.; BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

POSTGATE, John Raymond. The fundamentals of nitrogen fixation. **CUP Archive**, 1982.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Qualidade e produtividade de cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008, 58f. Dissertação (Mestrando em Agricultura Tropical e Subtropical), – Instituto Agronômico, Campinas - SP, f. 58, Jan. 2008.

REIS V M, SPAEPEN S AND VANDERLEYDEN J. Bacterial endophytes. N<sub>2</sub>-fixing endophytes in grasses/cereals and molecular signals involved. **In: Ecological aspects of plant nitrogen metabolism**. Ed. Wiley-Blackwell, JC Polacco, CD Todd, eds. B. Epi and Endo-phytic microbes, 2011.

RENNIE, R.J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, p.8-14, 1981.

Rouatt, J.W.; Katznelson, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. **J. Appl. Bacteriol.** 24: 164-171, 1961.

SANTOS, A.A.; PINHEIRO NETO, L.G. **Podridão-de-esclerócio do melão no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.3, 2004.

SILVA, Paulo da. e NAHAS, Ely. Bacterial diversity in soil in response to different plans, phosphate fertilizers and liming. **Braz. J. Microbiol.** v.33, n.4, p.304-310, 2002.

SIQUEIRA, J. O. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras: UFLA/DCS, p.9, 1999.

SOUSA,V.F.; RODRIGUES, B.H.N.;ATHAYDE SOBRINHO, C.; COELHO, E.F.; VIANA, F.M.P.;SILVA,P.H.S. **Cultivo do meloeiro sob fertirrigação por gotejamento no meio-norte do Brasil**. Embrapa Meio-Norte, p.68, 1999.

SOUZA JÚNIOR, R. F.; OLIVEIRA, F. H. T.; SANTOS, H. C.; FREIRE, F. J. ARRUDA, J. A. **Frações de fósforo inorgânico do solo e suas correlações com o fósforo quantificado por extratores e pelo milho**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 1, p. 159-169, 2012.

SPRENT, J. I.. **Nodulation in Legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.

SPRENT, Janet I.; JAMES, Euan K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in?. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 575-581, 2007.

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.959-970, 2002.

SUR, S.; BOTHRA, A.K.; SEN, A. Symbiotic Nitrogen Fixation – A Bioinformatics Perspective. **Biotechnology**, v.9, ed.3, p.257-273, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TROEH, F. R.; THOMPSON, L. M. **Solos e fertilidade do solo**. São Paulo, Andrei, p. 718, 2007.

ZENG, C. Z.; BIE, Z. L.; YUAN, B. Z. Determination of optimum irrigation water amount for drip-irrigated muskmelon (*Cucumis melo* L.) in plastic greenhouse. **Agricultural Water Management**, v. 96, p.595-602, 2009.

WINOGRADSKY, M.S. “Recherches sur les organismes de la nitrification”, **Annals Institute Pasteur**, Vol. 5, p. 155, 1890.