

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTERIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIADAS A

Vigna unguiculata (L.) Walp

Jardel da Silva Souza^{1*}, Adriana Ferreira Martins²

1. Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Agronomia PPGA/UFPB

2. Bióloga, PNPD em Ciência do Solo PPGCS/UFPB - Orientadora

Resumo:

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) muito conhecido como feijão-macassar e feijão-de-corda, é incluída entre as principais culturas de subsistência dessas regiões, com mais importância no sertão nordestino, contudo a aplicação de insumos minerais industrializados contribui para o encarecimento na produção. Com isso a utilização de insumos biológicos que possa substituir os químicos industrializados tem sido cada vez mais frequente na agricultura. O feijão-caupi apresenta baixa especificidade da cultura em relação ao microssimbionte apresentando-se como um fator limitante à exploração desta tecnologia, tendo em vista que as bactérias nodulantes presentes no solo, além de ser competitivas e estar em maior número, apresentam uma eficiência variável na FBN. Diante do exposto, objetivou-se selecionar isolados de rizóbios nativos de solos agrícolas do município de Areia (PB), para plantas de feijão-caupi, como também caracterizar e avaliar os isolados de rizóbios obtidos, tendo como comparação a estirpe recomendada 03-84-6/2010 UFLA. Os experimentos com plantas foram conduzidos em ambiente semi protegido do DSER. De acordo com os resultados obtidos após os 40 dias, pode-se constatar que todos os tratamentos estavam com nódulos, com exceção da segunda repetição do tratamento sem nitrogênio. E foram obtidos 8 grupos distintos de rizóbios nativos. Conclui-se que os solos da zona úmida da Caatinga em Areia-PB possuem bactérias nitrificantes nativas capazes de nodular e fixar nitrogênio.

Autorização legal: CAPES e CNPq

Palavras-chave: Feijão caupi; caatinga; microbiologia.

Apoio financeiro: CNPq/UFPB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFPB

Introdução:

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). é uma espécie pertencente à família Fabaceae. Sendo uma cultura originária da África, teve a sua introdução no Brasil na segunda metade do século XVI, trazida pelos colonizadores portugueses e implantada no estado da Bahia. (FREIRE FILHO, 1988), posteriormente sendo disseminado por todo país. Entretanto, mesmo sendo uma cultura considerada de subsistência, possui uma expressão socioeconômica na agricultura do norte e nordeste, considerada uma das principais fontes de proteína obtida com baixo custo para alimentação humana, apresentando uma grande variabilidade entre as cultivares (BERTINE et al., 2009).

Os cultivos praticados no estado são de baixo nível tecnológico (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2002). Necessitando assim aplicações de insumos minerais industrializados, o que contribui para o encarecimento na produção como também os impactos advindos de práticas realizadas sem respeitar a necessidade da cultura e a fertilidade do solo. Com essa necessidade, a utilização de insumos biológicos que possa substituir os químicos industrializados tem sido cada vez mais frequente na agricultura (MELO & ZILLI, 2009)

Com isso, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) vem se mostrando indispensável na sustentabilidade da agricultura brasileira, tendo em vista a disponibilização de nitrogênio para as culturas com um baixo custo econômico e também com baixo impacto ambiental (HUNGRIA et al., 2007). Entretanto, mesmo o feijão-caupi sendo uma cultura que apresenta ampla capacidade na FBN, nem sempre se obtém respostas positivas no uso de inoculantes em campo, uma das razões para isso é o fato dos cultivos, serem realizados na maioria das vezes, em condições de baixo aporte tecnológico e em condições de subsistência e apresentando baixa especificidade na nodulação (ZILLI et al., 2008).

Por esta razão, é importante estudar estratégias que possa avaliar a composição e a contribuição de estirpes de rizóbios nativos do solo onde se pretende introduzir o inoculante (ZILLI, 2001). Deste modo espera-se que os solos de Areia possuam grande quantidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, assim, esse trabalho teve como objetivo selecionar isolados de rizóbios nativos de solos agrícolas do município de Areia

(PB), para plantas de feijão-caupi, como também caracterizar e avaliar os isolados de rizóbios obtidos tendo como comparação a estirpe recomendada 03-84-6/2010 UFLA.

Metodologia:

O município de Areia, local de estudo, está localizado na microrregião geográfica do brejo paraibano a 574 m de altitude e (Lat. -6° 58"; Long. 35° 41") onde apresenta uma temperatura média anual de 24,0°C com uma pluviosidade média anual de 1400 mm, umidade relativa, média de 80% e de acordo com Koppen (1936) o clima é classificado com As, ou seja, clima tropical, semi-úmido, Thornthwaite (1948), classifica o clima da região como B1 Ra „a”, que é um clima úmido, apresentando pouca deficiência de umidade, megatérmico, com pequena variação de temperatura.

Foram coletadas duas amostras de solos de classificação Latossolo Amarelo Distrófico húmico (EMBRAPA, 2013) de onde anteriormente tinha sido cultivado o feijão-caupi no município de Areia, estado da Paraíba, uma amostra foi coletada na estação experimental Chã de Jardim de uma área de pousio de 10 anos e a outra amostra foi do distrito de Mata Limpa coordenadas: Altitude 563 m, S 06°54'20,8" X, W 35°40'52,0" Y em que a prática se dá sem insumos químicos, com vistas à obtenção do maior número possível de isolados de rizóbios autóctones capazes de nodular esta espécie. Amostras dos solos foram enviadas ao Laboratório de Análise de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos e Engenharia Rural da UFPB para determinação das características químicas (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química dos solos utilizados na obtenção de nódulos ML: Mata limpa; CJ: Chã de jardim.

SOLO	pH	P	K	Na	Ca+Mg	Ca	Mg	Al	H+Al	C	MO	SB	CTC	V
		---mg dm ⁻³ ---			-----cmolc dm ⁻³ -----					----g Kg---		%		
ML	5,5	11,3	95,2	0,06	1,35	0,73	0,62	0,3	4,7	9,85	17	1,66	6,36	26
CJ	5,2	3,12	34,7	0,07	0,85	0,55	0,3	0,45	7,34	15,7	27,1	1,01	8,35	12,1

ML: Mata limpa; CJ: Chã de Jardim.

Para a obtenção de nódulos a partir das amostras de solo e o isolamento das bactérias seguiu-se a metodologia de Vincent (1970). Foi realizado um experimento com a inoculação de plântulas de *Vigna unguiculata* com uma suspensão dos solos amostrados em um ambiente semi-protegido. E a solução nutritiva foi de acordo com Sarruge (1975).

A avaliação da morfologia das colônias foi realizada a partir da inoculação dos isolados diluídos 6x, em placas de Petri contendo meio de cultivo LMV, com pH 6,8 a partir de 24 horas da incubação a 28°C, sendo avaliado o tamanho, forma, elevação, bordas (lisa ou irregular), superfície (lisa ou granular), cor, densidade ótica (opaca, translúcida, transparente) e consistência ao toque com alça (gomosa, pastosa, viscosa ou aquosa). Também foi realizado teste de Gram. Ao final os dados tabelados da caracterização morfológica dos isolados no software Excel, foram utilizados para geração de dendrograma de similaridade de Jaccard.

Resultados e Discussão:

De acordo com os resultados obtidos após os 40 dias, pode-se constatar que todos os tratamentos estavam com nódulos, com exceção da segunda repetição do tratamento sem nitrogênio. Este resultado não seria positivo se o trabalho fosse para avaliar características das plantas como para eficiência de nitrogênio e demais parâmetros que necessite das plantas, tendo em vista que não haveria controle, entretanto para fins de seleção e caracterização microbiológica este resultado não vem a ser considerado negativo. Esta contaminação dos tratamentos controle pode ter sido ocasionada pelo tempo de autoclavagem dos substratos tendo em vista que a areia antes de autoclavar já estaria contaminada com bactérias do grupo rizóbio que sobreviveram a autoclavagem de 121°C a 90 minutos ou causados pelas condições do ambiente já que o experimento foi conduzido em condições semi controladas se assemelhando a condições de campo. Conforme Mazaro et al. (2007) que avaliou o tempo de autoclavagem do substrato com intervalo, constatou que duas autoclavagens de 30 minutos a 121°C com um intervalo entre as duas de 24 horas, possibilita a completa esterilização do substrato, onde os microrganismos que resistiram a primeira exposição ao calor e pressão, não suportam uma segunda exposição.

Contudo os resultados coletados ao final da caracterização morfológica dos isolados demonstraram um total de 37 isolados provenientes dos nódulos das plantas mais um isolado da estirpe recomendada, que foram agrupados em oito grupos geneticamente semelhantes de acordo com o dendrograma (Figura 1).

microbiológica de rizóbios nativos e que o crescimento de bactérias do grupo rizóbio não é influenciado pela localização geográfica nem pelas condições de umidade e pluviosidade local. Entretanto, se faz necessário a continuação de mais estudos destes microrganismos e seu potencial na fixação de nitrogênio na cultura do feijão-caupi na Paraíba.

Referências bibliográficas

- BERTINI, C. H. C. M.; TEÓFILO, E. M.; DIAS, F. T. C. Divergência genética entre acessos de feijão caupi do banco de germoplasma da UFC. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n. 01,p. 99-105, 2009
- CHAGAS JUNIOR, A.F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R.R.; SANTOS, G.R.; CHAGAS,L.F.B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE. v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília, 353p. 2013.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 1988. p. 26-46.GIANLUPPI, D. Características pedoclimáticas dos cerrados. Boa Vista: Embrapa Roraima, 1997. 2p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 04).
- FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**. V. 66, n.3, p. 497-504, 2007.
- HARA, F.A. dos S.; OLIVEIRA, L.A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, p.343-357, 2007.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- KÖPPEN, W. Der geographische system der klimate. In: KOPPES, W., GEIGER, R. (Ed.) Handbuch der klimatologie. Berlim: Borntrager, 1936. v.1 part c. THORNTHWAITTE, C.W. An approach towards a rational classification of climate. Geographical Review, London, v.38, p.55-94, 1948.
- MAZARRO, S.M.; GUIMARÃES, S.S.; SZEPAHUK, V.; RODRIGUES, M.B.; PALADINI, M.V. Avaliação do tempo de autoclavagem sobre o potencial de contaminação de substrato na técnica de produção em serragem de cogumelos ganoderma lucidum. **Synergismus scyentifica**. UTFPR. Pato Branco, n. 02, p. 1-4, 2007.
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.
- OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L. de; MEDEIROS, R. D. de; SILVA, P. R. V. P.; SMIDERLE, O. J.; MOURÃO JÚNIOR, M. Técnicas de manejo para o cultivo do caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2002. 19p. (Embrapa Roraima. Circular Técnica, 03).
- SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; BORGES, W.L.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.; NASCIMENTO, L.R.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; BEZERRA, R.V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p. 20-27, 2007.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. Summa Phitopathologica, Piracicaba, v.1, n.3, p.231- 234, 1975.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 164p. 1970.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.
- ZILLI, J. L. E. Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] em áreas do cerrado. 2001. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- ZILLI, J.E.; MARSON, B.F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, abr.2008.
- MELO, S.R.; ZILLI, J.E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesq. Agropec. Bras.**, 44:1177-1183, 2009.