

# Características Fenotípicas de Bactérias de Nódulos de Feijão-caupi Nativas de um Argissolo Vermelho Amarelo em Petrolina, PE

## Phenotypic Characteristics of Native Bacteria from Cowpea Nodules in Yellow Ultisol in Petrolina, PE

*Aleksandro Ferreira da Silva*<sup>1</sup>; *Kelly Alexandra Souza Menezes*<sup>2</sup>; *Carlos Antonio da Costa de Aguiar*<sup>3</sup>; *Adriana Bezerra dos Santos*<sup>4</sup>; *Xênia Bastos de Oliveira*<sup>5</sup>; *Pâmella Thalita Souza Sena*<sup>6</sup>; *Sirando Lima Seido*<sup>7</sup>; *Lindete Míria Vieira Martins*<sup>8</sup>; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*<sup>9</sup>

### Abstract

This study aimed to evaluate the phenotypical characteristics of bacterial isolates from cowpea nodules (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), grown in a Yellow Ultisol, in Petrolina, Pernambuco, Brazil. The experiment was carried out in greenhouse conditions, in a randomized block design with three replications and two cowpea varieties (BRS Pujante and BRS Carijó). After 35 days of plant emergence, the nodules were collected and the bacteria isolated and analyzed for cultural characteristics in YMA media. 396 isolates, 239 of BRS Pujante and 157 of BRS Carijó were obtained. Most of the isolates showed rapid growth habit, 60% and 80%, ability to acidify the media, 52% and 49%, and the ability to produce much mucus, 60% and 77% for BRS Pujante and BRS Carijó, respectively. Bacteria with rapid growth characteristics that acidified the media and produced much more mucus were prevalent in cowpea nodules grown in soil semi-arid climate of the region.

**Keywords:** Semiarid, legumes, rhizobia, FBN.

### Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa muito utilizada por pequenos produtores e é uma cultura que requer baixa tecnologia para seu cultivo. De origem africana (FREIRE FILHO et al., 2011), possui ampla distribuição geográfica, principalmente em regiões onde é necessária tolerância a altas temperaturas e à seca. Em regiões semiáridas, o feijão-caupi, que é uma importante fonte de proteínas, está associado a cultivos de subsistência (SOUZA et al., 2014), de modo que boa parte da produção é utilizada na alimentação dos próprios agricultores.

<sup>1</sup>Mestre em Agronomia – Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, alexs.agro@gmail.com.

<sup>2</sup>Mestre em Horticultura Irrigada, Universidade do Estado Da Bahia (Uneb), Juazeiro, BA, kelly\_alexandra@hotmail.com.

<sup>3</sup>Graduando em Engenharia Agrônoma, Uneb, Juazeiro, BA, carlosantonionuneb@gmail.com.

<sup>4</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, Uneb, drik.b@hotmail.com.

<sup>5</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, Uneb, Juazeiro, BA, xenia\_bastos15@hotmail.com.

<sup>6</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, Uneb, Juazeiro, BA, pamellathalita@gmail.com.

<sup>7</sup>Doutorando do Programa de Pós-graduação em Melhoramento Vegetal de Plantas, UFRPE, Recife, PE, siroseido@hotmail.com.

<sup>8</sup>Professora Titular do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Uneb, Juazeiro, BA, lmvmartins@uneb.br.

<sup>9</sup>Biólogo, D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

Uma das características dessa cultura é a formação de simbiose com organismos diazotróficos capazes de converter o nitrogênio molecular em formas amoniacais, disponibilizando-as à planta em troca de carboidratos. Este processo é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) e é um recurso essencial para transformar o  $N_2$  na forma inorgânica combinada  $NH_3$  e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos (CANTARELLA et al., 2007).

Segundo Menezes et al. (2012), solos de regiões semiáridas apresentam baixa fertilidade natural e, um dos nutrientes pouco disponíveis e deficientes nesses solos é o nitrogênio (FREIRE FILHO et al., 2005). Em decorrência de sua baixa disponibilidade, o meio comumente utilizado para fornecê-lo na agricultura é pelo uso de fertilizantes minerais. Neste contexto, a FBN constitui-se num importante processo que pode ser utilizado em substituição parcial ou total dos fertilizantes nitrogenados industrializados.

Apesar da utilização de técnicas moleculares para a determinação da diversidade microbiana, a avaliação das características fenotípicas é um passo fundamental que permite a primeira descrição de micro-organismos até então desconhecidos. Essas características podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados (CHAGAS JÚNIOR et al., 2010).

Com este estudo, objetivou-se avaliar as características fenotípicas de bactérias de nódulos de feijão-caupi nativas de um Argissolo Vermelho Amarelo no Município de Petrolina, PE.

## Material e Métodos

O solo localizado no Projeto Bebedouro (campo experimental da Embrapa Semiárido), Petrolina, PE, foi coletado no horizonte superficial (camada de 0-20 cm), homogeneizado, passado em peneira com malha de abertura de 2 mm e, em seguida, acondicionado em vasos de poliestireno com capacidade para 500 g. Para a obtenção da amostra composta, dez subamostras de solos foram coletadas para que se obtivesse maior representatividade da área.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e duas variedades de feijão-caupi (BRS Pujante e BRS Carijó). As sementes foram desinfestadas superficialmente em etanol (70%) por 1 minuto para a modificação da tensão superficial, imersas hipoclorito de sódio (2,5%) por 5 minutos e lavadas dez vezes em água destilada estéril (ADE). Em seguida, quatro sementes foram semeadas por unidade experimental. As plantas receberam água, conforme necessário, e foram coletadas aos 35 dias após emergência (DAE). Na ocasião da coleta, as raízes foram separadas da parte aérea para a obtenção dos nódulos. Após a lavagem das raízes, os nódulos foram destacados e contados. A partir daí, iniciou-se o processo de isolamento.

O isolamento foi realizado logo após a coleta das plantas em casa de vegetação, com os nódulos ainda frescos, com o objetivo de diminuir a proporção de isolados contaminantes. Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente com etanol comercial (92,8 °GL) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,5%) por 1 minuto, seguidos de dez lavagens em ADE. Com o auxílio de uma pinça, os nódulos foram pressionados sobre placas de Petri com meio de cultura YMA com adição de corante vermelho congo (0,25% em 0,2N de KOH). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C e o aparecimento das colônias foi monitorado diariamente.

Após o aparecimento das colônias características, os isolados bacterianos foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol (VINCENT, 1970), incubadas nas mesmas condições descritas por um período de até 7 dias. Com os isolados já crescidos, foram determinadas as seguintes características fenotípicas: acidez do meio, tempo de crescimento, tamanho, forma, aparência, transparência, cor e elevação das colônias e presença, quantidade e tipo de muco.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 396 isolados bacterianos. Desse total, 239 foram isolados de nódulos da cultivar BRS Pujante e 157 da BRS Carijó.

Dos isolados da cultivar BRS Pujante, 60% apresentaram crescimento rápido, 24% crescimento intermediário e 16% crescimento lento. Os isolados que produziram muito muco corresponderam a 60%, ficando o restante no grupo com baixa capacidade de produção de muco. No que diz respeito à reação de pH, 52% das bactérias acidificaram o meio de cultura, 37% não alteraram o pH e apenas 11% alcalinizaram.

Quanto aos isolados da cultivar BRS Carijó, 80% apresentaram crescimento rápido, 18% crescimento intermediário e apenas 2% crescimento lento. Com relação à quantidade de muco, os isolados que produziram muito muco corresponderam a 77%, sendo o restante pertencente ao grupo dos isolados com baixa capacidade de produção de muco. Quanto à reação de pH, 49% das bactérias acidificaram o meio de cultura, 45% não alteraram o pH e apenas 6% alcalinizaram.

Como pode ser observado, a maioria dos isolados bacterianos obtidos neste estudo apresentaram crescimento rápido. Recentemente, bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos do Semiárido apresentaram essa característica, conforme observado por Leite et al. (2009) e Fernandes Júnior et al. (2012). Segundo Sprent (1994), bactérias do grupo dos rizóbios que apresentam crescimento rápido são comuns e mais adaptadas às regiões semiáridas possuem um artifício de sobrevivência nessas condições, tendo em vista que são mais tolerantes à seca do que aquelas de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em um curto período de tempo úmido (SANTOS et al., 2007).

Em estudos desenvolvidos com o objetivo de verificar a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam feijão-caupi em solos do Submédio do Vale do São Francisco, Leite et al. (2009), observaram que dos 581 isolados obtidos, 62% foram de crescimento rápido e 63% acidificaram o meio de cultura. Medeiros et al. (2009), também avaliando isolados oriundos de nódulos de feijão-caupi cultivados em diferentes solos do Estado do Rio Grande do Norte, obtiveram uma coleção de 304 bactérias, da qual todos os isolados apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio de cultura. Leite et al. (2009) sugerem que o grande número de isolados de crescimento rápido associados ao feijão-caupi pode ser consequência de mudanças climáticas como, por exemplo, o aumento gradual da temperatura.

Diferentemente de estudos que avaliaram a diversidade de rizóbios em solos do Semiárido (MARTINS et al., 2003; LEITE et al., 2009), os resultados obtidos demonstram que há abundância de bactérias que não alteram o pH do meio de cultura. Esse resultado pode indicar a presença de grupos bacterianos ainda não isolados na região, podendo, assim, representar espécies ainda não descritas.

## Conclusão

O feijão-caupi cultivado no Argissolo Vermelho Amarelo foi predominantemente nodulado por bactérias com características de crescimento rápido, que acidificam o pH do meio e que produzem muito muco.

## Referências

- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; VENEGAS, V. H. A.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 11, p. 2945-2951, 2012.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília-DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; CARDOSO, M. J.; AZEVEDO, J. N.; RAMOS, S. R. R.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D. **Coleção ativa de germoplasma de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e de outras espécies do gênero *Vigna*, da Embrapa Meio-Norte, no período de 1976 a 2003**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 125 p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 209).
- LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.
- MARTINS, L. M. V.; RANGEL, F. W.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v. 38, p. 333-339, 2003.
- 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, p. 529-535, 2009.
- MENEZES, R. S. C.; PRIMO, D. C.; MARTINS, J. C. R.; JESUS, K. N.; ALTHOFF, T. D. Fertilidade dos solos no Semiárido. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 30.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 14.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 12.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 9.; SIMPÓSIO SOBRE SELÊNIO NO BRASIL, 1., 2012, Maceió. **A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola: anais**. Viçosa, MG: SBCS, 2012. 1 CD-ROM.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v. 2, p. 249-256, 2007.
- SOUZA, H. A.; CAVALCANTE, A. C. R.; TONUCCI, R. G.; POMPEU, R. C. F. F.; SOUZA, M. M. R.; MAIA, C. E. Níveis críticos para atributos do solo pela distribuição normal reduzida em culturas anuais de subsistência. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 18, n. 4, p. 425-430, 2014.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 161, p. 1-10, 1994.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.