

Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas

Co-inoculation rhizobia and *Bacillus subtilis* in cowpea and Leucaena: effects on nodulation, N₂ fixation and plant growth

Ademir Sérgio Ferreira de Araújo^{I*} Romero Francisco Vieira Carneiro^{II}
Antônio Aécio Carvalho Bezerra^{II} Fábio Fernando de Araújo^{III}

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação entre o rizóbio e o *Bacillus subtilis* sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e da leucena (*Leucaena leucocephala*) cultivados em um Latossolo vermelho. Os tratamentos consistiram de: a) testemunha; b) fertilização com NPK; c) inoculação com rizóbio + PK; e d) inoculação com rizóbio + *Bacillus subtilis* + PK. Houve um aumento na nodulação do feijão-caupi com a coinoculação. A massa da parte aérea seca, o acúmulo de N e a leitura da clorofila em feijão-caupi foram maiores nos tratamentos fertilizados (NPK) e no tratamento coinoculado. No caso da leucena, não houve diferenças entre os tratamentos NPK, inoculado e coinoculado. As massas das raízes secas do feijão-caupi e leucena aumentaram com a coinoculação. A coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* favoreceu o aumento na nodulação em feijão-caupi e tem potencial para aumentar a fixação biológica do N₂ e o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Rizobactérias, leguminosas, *Bradyrhizobium*.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Bacillus subtilis* on nodulation, N₂ fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and leucaena (*Leucaena leucocephala*) grown in a red Oxisol. Treatments consisted by: a) control; b) NPK; c) inoculation with *Bradyrhizobium* + PK; d) co-inoculation *Bradyrhizobium* + *Bacillus subtilis* + PK. There was an increase in nodulation of cowpea with co-inoculation. The shoot dry weight, N accumulation and chlorophyll were higher in both co-

inoculated and fertilized (NPK) treatments. For leucaena, there were not differences between NPK, inoculated and co-inoculated treatments. The dry weight roots of cowpea and leucaena increased with co-inoculation. The co-inoculation *Bradyrhizobium* and *Bacillus subtilis* favored the increase in nodulation of cowpea and it has potential to increase biological N₂ fixation and plant growth.

Key words: Rhizobacteria, legumes, *Bradyrhizobium*.

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas. Dentre os gêneros mais estudados, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e rizóbios (ARAÚJO, 2008). No caso dos rizóbios, a sua interação com as leguminosas é um exemplo de uma simbiose intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA et al., 2008).

A interação entre os rizóbios e o *Bacillus* pode estimular a simbiose e favorecer o processo de FBN. Segundo LI & ALEXANDER (1988), o *Bacillus* pode aumentar a nodulação e a competitividade do rizóbio pelos múltiplos efeitos positivos na rizosfera das plantas. ARAÚJO & HUNGRIA (1999) estudaram

^IUniversidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Campus da Socopo, 64000-000, Teresina, PI, Brasil. E-mail: asfaruaj@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}UFPI, Campus de Bom Jesus, Bom Jesus, PI, Brasil.

^{III}Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Campus II, Presidente Prudente, SP, Brasil

a coinoculação *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/elkanii* em soja e observaram que houve um aumento na nodulação e produtividade de grãos com o uso desses microrganismos conjuntamente.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e a leucena (*Leucaena leucocephala*) são leguminosas utilizadas no Nordeste do Brasil para diferentes fins. O feijão-caupi, também conhecido por feijão macassar ou feijão-de-corda, é uma das alternativas de alimento para a população de baixa renda da região Nordeste do Brasil (FREIRE FILHO et al., 2005). A leucena é utilizada para melhoria dos solos, produção de madeira, lenha, adubo orgânico e fonte de proteínas, vitaminas e sais minerais para os animais no período seco (ARAÚJO et al., 2006).

Devido à capacidade dessas leguminosas de, em simbiose com o rizóbio, realizar a FBN, a coinoculação rizóbio e *Bacillus* pode proporcionar aumento na nodulação e incrementar a fixação do N₂ atmosférico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com sacos plásticos com 2kg de um Latossolo vermelho coletados na profundidade de 0-20cm. Os principais parâmetros de fertilidade do solo, analisados conforme NOGUEIRA & SOUSA (2005), são: pH 6,0; Matéria orgânica 15,3g kg⁻¹; P, 11,3mg dm⁻³; K, 0,49; Ca + Mg, 4,0 e CTC 7,44cmol_c dm⁻³. Em cada experimento, os tratamentos consistiram de: a) testemunha; b) fertilização com NPK; c) inoculação com rizóbio + PK; e d) inoculação com rizóbio + *Bacillus subtilis* + PK. A adubação nitrogenada, fosfatada e potássica foi realizada, na véspera do plantio, utilizando-se uréia (110mg saco⁻¹), superfosfato simples (200mg saco⁻¹) e cloreto de potássio (50mg saco⁻¹), sendo equivalentes a 80, 60 e 40kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O, respectivamente.

A inoculação foi realizada com inoculantes turfosos na concentração de 1,0.10⁹ células g⁻¹ contendo *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe BR-3262 e *Bradyrhizobium* sp, estirpe BR 96, para o feijão-caupi e a leucena, respectivamente. As sementes de leucena foram submetidas à quebra de dormência com água quente durante 90 segundos. Em seguida, as sementes de feijão-caupi e leucena foram inoculadas separadamente utilizando-se uma solução açucarada a 10% para servir como aderente para o inoculante que foi aplicado na dose de 500g de inoculante para 50kg de sementes. O mesmo procedimento foi realizado para inoculação do *Bacillus subtilis* e, nesse caso, foi utilizado um produto formulado em pó contendo o isolado PRBS-1 (ARAÚJO, 2008), na concentração de

1,0.10⁹ esporos g⁻¹, aplicado na mesma dose. A semeadura foi realizada utilizando cinco sementes por saco, e o desbaste foi realizado aos cinco dias após a emergência, deixando-se uma planta por saco. Os sacos foram irrigados diariamente, para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo.

A avaliação foi realizada aos 40 e 80 dias após emergência do feijão-caupi e da leucena, respectivamente, sendo determinados o número e a massa dos nódulos, a matéria seca da parte aérea e das raízes, a relação raiz/parte aérea, o acúmulo de N na parte aérea (ANPA) e a leitura da clorofila nas folhas (utilizando um equipamento portátil Clorofilog). Em seguida, as plantas foram coletadas, e as raízes foram separadas da parte aérea na base do caule. Os nódulos foram destacados, contados e colocados para secar em estufa a 65°C, por 72 horas, sendo, em seguida, determinada a sua massa. A parte aérea e as raízes foram colocadas para secar em estufa a 65°C, por 72 horas. O N total foi determinado pelo método semimicrokjedahl. O N acumulado na matéria seca da parte aérea foi calculado, multiplicando-se o peso pelo teor de N.

O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados, com seis tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística ASSISTAT, versão 7.4 beta, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

Não houve nodulação nos tratamentos sem inoculação, indicando que a população nativa não foi suficiente para nodular o feijão-caupi e a leucena (Tabela 1). Dessa forma, há necessidade de proceder à inoculação das sementes com inoculantes rizobianos no sentido de promover a nodulação e a FBN (XAVIER et al., 2008). Nos tratamentos inoculados, houve um aumento na nodulação do feijão-caupi com a coinoculação, sugerindo uma influência do *Bacillus subtilis* na promoção de nodulação pela *Bradyrhizobium* inoculado. Essa influência pode ser devido à contribuição no aumento de competitividade da bactéria inoculada, ao aumento dos sítios de infecção e à ação inibitória do crescimento de fungos nas raízes (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999).

A matéria seca das raízes do feijão-caupi e da leucena aumentou com a coinoculação (Tabela 1), sugerindo um efeito positivo do *Bacillus* sobre o crescimento radicular. Segundo ARAÚJO & HUNGRIA (1999), *Bacillus subtilis* induz na planta a síntese de fitohormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas que favorecem o crescimento das raízes e o aumento no número dos pelos radiculares. Isso propicia mais sítios de infecção para o rizóbio e aumento da nodulação (KROLOW et al., 2004).

Tabela 1 - Efeito da coinoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis* sobre o número (NN), a massa dos nódulos secos (MNS), a matéria seca da parte aérea (MSPA) e as raízes (MSR), a leitura de clorofila e o acúmulo de N na parte aérea (ANPA) em feijão-caupi e leucena.

	NN (nod pl ⁻¹)	MNS (mg pl ⁻¹)	MSPA (g pl ⁻¹)	MSR (g pl ⁻¹)	Clorofila (leitura)	ANPA (%)
----- Feijão-caupi -----						
Test	0,0 c	0,0 c	1,6 c	1,2 c	39 c	1,6 c
NPK	0,0 c	0,0 c	4,8 a	2,5 b	60 a	3,6 a
Riz. + PK	20 b	186,3 b	4,0 b	2,6 b	47 b	2,8 b
Riz. + Bac. + PK	44 a	312,5 a	4,6 a	3,3 a	61 a	3,7 a
CV (%)	17,1	9,4	7,4	6,6	7,4	6,6
----- Leucena -----						
Test	0,0 b	0,0 c	0,7 b	0,8 b	32 b	1,9 b
NPK	0,0 b	0,0 c	1,1 a	1,0 b	51 a	3,4 a
Riz. + PK	96 a	26,2 a	1,0 a	0,9 b	54 a	3,5 a
Riz. + Bac. + PK	113 a	32,5 a	1,0 a	1,4 a	52 a	3,8 a
CV (%)	21,3	8,5	9,7	9,4	9,7	9,4

Test – testemunha; NPK – fertilização completa; Riz + PK – inoculação com rizóbio + fósforo e potássio; Riz + Bac. + PK - inoculação com rizóbio + *Bacillus subtilis* + fósforo e potássio.

Os valores para a matéria seca da parte aérea, a leitura da clorofila e o acúmulo de nitrogênio no feijão-caupi foram maiores nos tratamentos com fertilização nitrogenada (NPK) e com coinoculação (Tabela 1). No caso da leucena, não houve diferenças entre os tratamentos NPK, inoculado e coinoculado. Os menores valores para essas variáveis no feijão-caupi e na leucena foram observados na testemunha.

Os maiores valores para a matéria seca da parte aérea, a leitura da clorofila e o acúmulo de nitrogênio no feijão-caupi estão diretamente associados ao fornecimento de N pela fertilização mineral (tratamento com NPK) e pela fixação biológica do N₂ (inoculação). Nesse caso, observa-se que o *Bacillus subtilis* pode ter influenciado positivamente a fixação de N₂ pelo *Bradyrhizobium*, aumentando o crescimento das plantas e acúmulo de N no feijão-caupi. Outros trabalhos mostraram o efeito positivo do crescimento das plantas pela coinoculação rizóbio e pelo *Bacillus* em feijão comum (KUSDRAS, 2003), soja (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999) e feijão-caupi (SILVA et al., 2006). O maior conteúdo de N nas folhas contribuiu para o aumento no conteúdo de clorofila, demonstrando o papel do N na formação da clorofila. Outros trabalhos mostraram essa relação intrínseca entre o N nas folhas e a leitura da clorofila em feijão-comum (DIDONET et al., 2005) e feijão-caupi (SILVA et al., 2009).

A coinoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis* favoreceu o aumento na nodulação em feijão-caupi. Essa associação microbiana apresenta grande potencial para aumentar a fixação biológica do N₂ e o crescimento das leguminosas.

REFERENCIAS

- ARAÚJO, A.S.F. et al. Growth and nodulation of *Leucaena* and *Prosopis* seedlings in soil plus tannery sludge. **Caatinga**, v.19, p.20-24, 2006.
- ARAÚJO, FF. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.456-462, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542008000200017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 09 mai. 2009. doi:10.1590/S1413-70542008000200017.
- ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *bacillus subtilis* e *bradyrhizobium japonicum* / *bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1633-1643, 1999.
- DIDONET, A.D. et al. Adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro irrigado: uso do clorofilometro. **Bioscience Journal**, v.21, p.103-111, 2005.
- FREIRE FILHO, F.R. et al. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519p.
- HUNGRIA, M. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.83-91, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008000100011&lng=pt&nrm=iso&tlng=PT>. Acesso em: 09 mai. 2009. doi: 10.1590/S0100-204X2008000100011.
- KROLOW, R.H. et al. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.2224-2230, 2004.

KUSDRAS, J.F. Nodulação do feijoeiro e fixação biológica do nitrogênio em resposta à microbiolização das sementes e à aplicação de micronutrientes. **Scientia Agraria**, v.4, p.81-96, 2003.

LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v.108, p.211-219, 1988.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. de. **Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 13p.

SILVA, V.N. et al. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de

cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.2, p.95-99, 2006.

SILVA et al. Fixação biológica do N₂ em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. **Bioscience Journal**, 2009. (no prelo).

XAVIER, T.F. et al. Influência da inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v.38, p.2037-2041, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000700038&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 09 mai. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000700038.