

# Ocorrência e caracterização de populações de bactérias nodulíferas fixadoras de N<sub>2</sub> oriundas de áreas de assentamento em Marabá, Pará, Brasil

## Occurrence and characterization of populations of nodule-inducing N<sub>2</sub> from settlement areas in Marabá, Pará, Brasil

Linnajara de Vasconcelos Martins Ferreira\*, Aliane Medeiros Carvalho e Agamenon Azevedo dos Reis

*Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará - Campus Rural Marabá, Marabá Pará, Brasil*  
(\*E-mail:linnajara.ferreira@ifpa.edu.br)

<https://doi.org/10.19084/rca.23478>  
Recebido/received: 2021.02.09  
Aceite/accepted: 2021.04.22

### RESUMO

O estudo das populações nativas edáficas pode revelar um reservatório de recurso genético para a seleção de estirpes eficientes, além de constituir um indicador das intervenções antrópicas. O objetivo do trabalho foi caracterizar e avaliar a ocorrência de populações de bactérias que nodulam e fixam N<sub>2</sub> utilizando o feijão caupi como planta isca. O estudo foi realizado em casa de vegetação do Instituto Federal do Pará, Campus Marabá Rural. As amostras de solo foram coletadas no Projeto de Assentamento 26 de Março em oito ambientes: três áreas individuais sob cultivo de banana e de mandioca, uma sob capoeira e uma sob floresta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições e oito tratamentos sendo estes constituídos pelas áreas de estudos. Aos 35 dias após emergências, as plantas foram coletadas para determinação do número de nódulos (NN), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). De cada tratamento realizou-se o isolamento de dez nódulos destinados a caracterização morfológica e fisiológica de suas colônias. A nodulação ocorreu em todos os tratamentos, apresentado uma grande variação de NN e produção de MSPA. Foram isoladas 53 estirpes demonstrando elevada diversidade cultural por meio das características morfológicas e fisiológicas.

**Palavras Chave:** rizóbio, comunidades nativas, feijão caupi, manejo do solo.

### ABSTRACT

The native edaphic population study can be a reservoir of genetic resources for the selection of efficient strains, besides being an indicator of anthropogenic activities. The aim of this work was to characterize and evaluate the occurrence of bacterial populations that nodulate and fix N<sub>2</sub> using cowpea as a bait plant. This study was carried out in a greenhouse situated at the Federal Institute of Pará, Campus Marabá Rural, Brasil. Soil samples were collected in the Settlement Project 26 de Março into eight environments: being three individual areas under banana and cassava cultivation, one under capoeira and one under forest. The experimental design was completely randomized with three replications and eight treatments, which consisted of the study areas. At 35 days after emergencies of the plants, they were collected to determine the number of nodules (NN), dry matter of the shoots (DMA) and root (DMR). From each treatment in this process, ten nodules were isolated for the morphological and physiological characterization of their colonies. Nodulation occurred in all treatments, with a large variation in NN and DMA production. Fifty-three strains were isolated demonstrating high cultural diversity through morphological and physiological characteristics.

**Keywords:** rhizobia, native communities, cowpea, soil management.

## INTRODUÇÃO

A mesorregião sudeste do Estado do Pará, Brasil, destaca-se por ter um número considerável de assentamentos rurais da reforma agrária, entre eles encontra-se o Projeto de Assentamento 26 de Março, no município de Marabá, que teve sua base sócio econômica marcada por ciclos de exploração dos recursos naturais, iniciados com a extração de Castanha (*Bertholletia excelsa*) e, posteriormente, a derrubada da floresta para atender a demanda de atividades madeireiras e agropecuárias (Castro e Watrin, 2013; Neves e Schimitz, 2018).

Atualmente, o Projeto de Assentamento 26 de Março se destaca principalmente pelo cultivo de mandioca (*Manihot esculenta*) e banana (*Musa* sp.), advindos dos estabelecimentos agrícolas familiares, com dinâmica de preparo de áreas através da prática do corte e da queima e com predominância de sistemas de cultivos que não adotaram a calagem para correção da acidez do solo e não realizaram adubações de fontes minerais e/ou orgânicas.

Os solos paraenses apresentam boas condições físicas como textura, estrutura e porosidade. Mas, quanto a condições químicas, apresentam baixa fertilidade, por serem muito intemperizados (Gama *et al.*, 2020). Sabe-se que uma das limitações para a sustentabilidade de áreas de plantio é a constituição química do solo, sendo o nitrogênio (N) considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal. Por outro lado, uma das formas de disponibilizar o N, em áreas de cultivo, é a utilização de espécies vegetais capazes de efetuar simbioses com bactérias que nodulam leguminosas (BNL) e fixam nitrogênio atmosférico. O processo ocorre no interior dos nódulos que são formados a partir de sinalizações moleculares entre a planta e a bactéria, podendo ser influenciado por fatores edafoclimáticos que podem originar uma redução na eficiência das estirpes (Dabessa *et al.*, 2018).

Estudos que permitam uma avaliação, mesmo que parcial, da ocorrência e da funcionalidade das populações de BNL podem fornecer informações úteis sobre as condições edáficas, além de serem importantes sob dois importantes aspectos. O primeiro é que o solo é um reservatório importante de recursos genéticos para a seleção de estirpes

eficientes, componentes das populações nativas (Soares *et al.*, 2006). O segundo refere-se ao conhecimento das populações nativas edáficas e suas alterações com as mudanças no manejo e nos atributos do solo, que podem constituir um indicador das intervenções antrópicas sobre a estrutura populacional do simbionte alvo em estudo (Melloni *et al.*, 2006). Para a análise da ocorrência e da potencialidade destas populações, em estudos exploratórios, a planta armadilha constitui mais uma variável a ser considerada, pois influencia na captura das bactérias nativas, já que sua capacidade de estabelecer simbiose é restrita a determinadas espécies de bactérias (Moreira e Siqueira, 2006). Dentre as leguminosas consideradas mais promíscuas encontra-se o feijão caupi (Melloni *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2018).

Desta forma, o isolamento e a caracterização de rizóbios noduladores de feijão caupi em solos de áreas com diferentes manejos e usos podem possibilitar a identificação e futura seleção de estirpes adaptadas a condições edafoclimáticas presentes. Importante ressaltar que a região amazônica tem se destacado por apresentar estirpes de bactérias com alto potencial de utilização na promoção do crescimento de diversas culturas não só por meio do processo da fixação biológica de N<sub>2</sub> (Almeida *et al.*, 2010) mas, também, por outros, tais como: inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, fixação biológica de nitrogênio de vida livre, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácidos indolacético (Oliveira-Longatti *et al.*, 2014) e indução de tolerância a acidez do solo e outros estresses abióticos (Soares *et al.*, 2014). Portanto, estudos utilizando bactérias isoladas da região amazônica, além de contribuir para o maior conhecimento da diversidade deste importante grupo de microrganismos nesta região, ainda podem ser promissores para o isolamento, por promoverem o crescimento vegetal de diversas culturas de importância social.

Apesar da relevância de pesquisas sobre o conhecimento de características peculiares de isolados bacterianos nodulíferos nativos, são escassos os trabalhos em ambientes como o Sudeste paraense. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar estirpes de bactérias que nodulam feijão caupi oriundos de diferentes áreas no Projeto de Assentamento 26 de Março, em Marabá, Estado do Pará, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Marabá Rural, com coordenadas geográficas (-5° 34' 11,972" S; -49° 6' 2,041" W), em Marabá, Pará, entre março e abril de 2020. As amostras de solos utilizadas no experimento foram oriundas de lotes produtores de mandioca, banana e áreas de capoeira<sup>1</sup> e de floresta localizadas no Projeto de Assentamento 26 de Março,

<sup>1</sup> No contexto amazônico, as capoeiras podem ser definidas como áreas que se desenvolvem a partir do crescimento de espécies que regeneram naturalmente em agroecossistemas ou após o seu abandono (Vieira e Proctor, 2007). Os principais exemplos de ecossistemas de capoeira na região amazônica são as áreas de pousio no sistema agrícola de corte e queima e a vegetação arbustivo-arbórea formada após o abandono de áreas de pastagens, geralmente muito degradadas (juquira).

região sudeste do Pará, no município já mencionado, sem a utilização de inoculantes comerciais. A identificação das áreas de coleta e características do manejo encontram-se no Quadro 1.

Cada área foi subdividida em três parcelas sendo destas coletadas 15 amostras simples na forma de *zig zag* na profundidade de 0-20 cm (Figura 1). Totalizando 45 pontos de coletas por área de estudo. Parte do solo foi utilizada para o experimento em vaso com a capacidade de 0,5 kg cada, com três repetições. Outra parte foi destinada a caracterização física e química das amostras de solo (Quadro 2).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições e oito tratamentos constituídos pelas áreas do Quadro 1.

**Quadro 1** - Identificação das áreas de coleta de solo em áreas de produção de banana, de mandioca e em áreas de referência no Projeto de Assentamento PA 26 de Março, no ano de 2018/2019

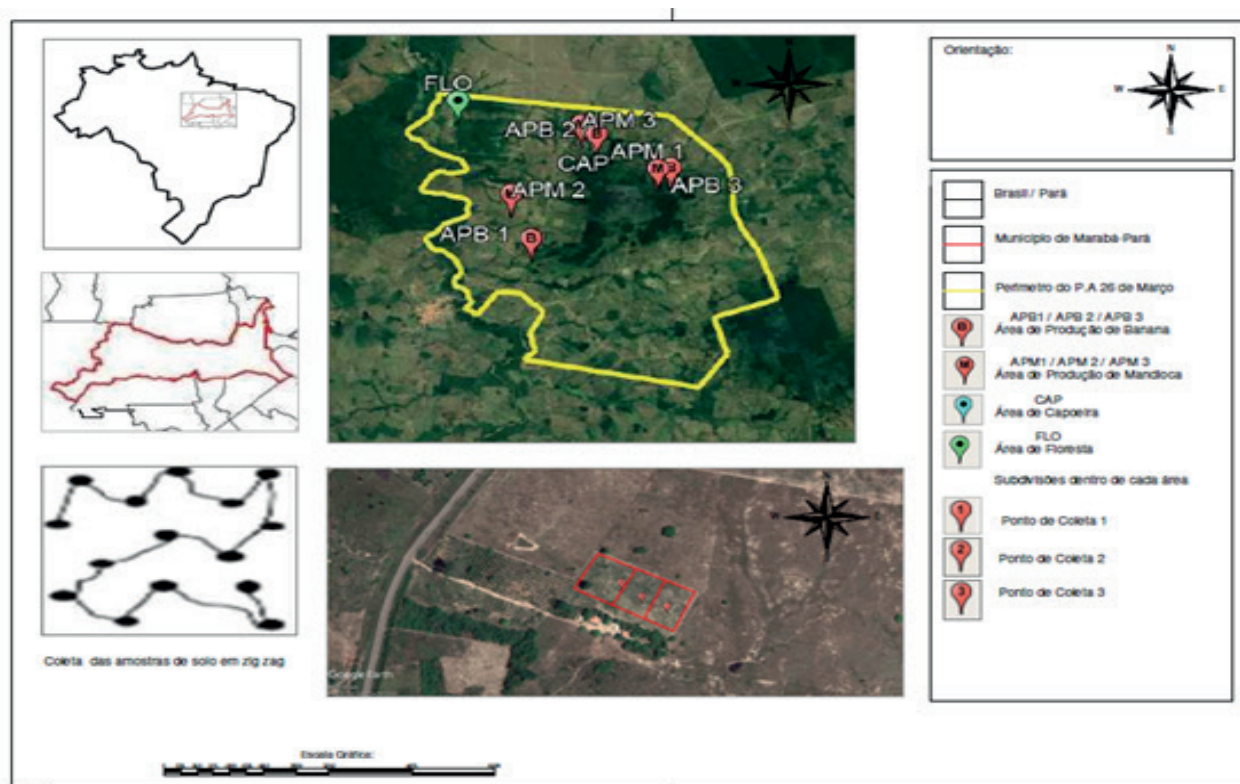
Área de produção de Banana Lote 1 – APB 1
Área de produção de 3,32 ha, com a retirada de 480 cachos/mês; correção do solo com calcário. A dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e da queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. É realizada a limpeza da área e a poda apenas uma vez ao ano, plantio solteiro; aplicação de herbicida Glifosato; plantas com idade de dois a três anos. Presença das cultivares Brs Conquista e Banana da terra.
Área de produção de Banana 2 - APB 2
Área de produção de 2,42 ha com a retirada de 120 cachos/mês; não realiza correção do solo; a dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e de queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. É realizada a limpeza da área e a poda de acordo com a necessidade da cultura plantio solteiro; plantas com idade de quatro anos. Presença das cultivares Brs Conquista, Couruda e Prata.
Área de produção de Banana 3 - APB 3
Área de produção de 9,68 ha com a retirada de 10 cachos/mês; não se realiza correção e adubação do solo; a dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e da queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. Não é realizada poda, plantio solteiro; plantas com idade de três a quatro anos. Presença das cultivares Brs Conquista, Banana-maçã e Pacovan.
Área de produção de Mandioca 1 – APM 1
A área total de produção apresenta 4,84 ha, destinada à fabricação de farinha, cujo rendimento é 4.000 kg farinha ha <sup>-1</sup> , comercializado por meio de atravessadores. O sistema é realizado em consócio com <i>Zea mays</i> . A dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e da queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. Presença da variedade Amazonas.
Área de produção de Mandioca Lote 2 – APM 2
A área total de produção apresenta 2,42 ha, destinada à fabricação de farinha, cujo rendimento é 3.000 kg ha <sup>-1</sup> , comercializado por meio de atravessadores. O sistema de cultivo da mandioca é realizado em consorciação com <i>Zea mays</i> e <i>Euterpe oleracea</i> . A dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e da queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. Presença da variedade Amazonas.
Área de produção de Mandioca Lote 3 – APM 3
A área total de produção apresenta 1,81 ha, destinada à fabricação de farinha, cujo rendimento é 2.400 kg ha <sup>-1</sup> , comercializado por meio de atravessadores. Adota o sistema de cultivo em monocultivo. A dinâmica de preparo das áreas ocorre através da prática do corte e da queima e ausência de sistema de preparo de área mecanizado. Não é adotada a calagem para correção da acidez do solo nem adubações de fontes minerais e/ou orgânicas. Presença da variedade Amazonas.
Área de Capoeira – CAP
Cultivo anterior de pastagem. Área com quatro anos em regeneração natural.
Área de Floresta – FLO
Floresta estabelecida. Área anteriormente utilizada com pastagem. Desde 1980, encontra-se em processo de regeneração natural. O Manejo Florestal ocorreu com enriquecimento da área com mudas de Cupuaçu ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ), Seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) e Castanha do Pará ( <i>Bertholletia excelsa</i> ).

**Quadro 2 -** Granulometria, classificação textural e médias de pH, teores de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), fósforo (p), Zinco (Zn), teores de alumínio (Al), hidrogênio + alumínio (H + Al), saturação por bases (V), saturação por alumínio (m) e matéria orgânica (MO) em três áreas de produção de Banana (APB1, APB2, APB3), três de Mandioca (APM1, APM2, APM3), Capoeira (CAP) e Floresta Plantada (FLO), no Projeto de Assentamento 26 de Março, Marabá, Pará, no ano de 2019

Áreas	Areia			Silte			Argila			Classe Textural		
	-----%-----											
APB1	57			9			34			Franco argilo arenoso		
APB2	65			8			27			Franco argilo arenoso		
APB3	50			10			40			Argilo Arenosa		
APM1	64,50			7,5			28			Franco-argilo-arenosa		
APM2	58,25			8,5			33,25			Franca		
APM3	87			4			9			Areia franca		
CAP	53			9			38			Argilo Arenosa		
FLO	75,75			5,5			18,75			Franco-arenosa		

Áreas	pH	Ca	Mg	K	P	Zn	Al	H+Al	CTC	V%	m%	MO
	$\text{CaCl}_2$	$\text{cmol dm}^{-3}$	$\text{cmol dm}^{-3}$	$\text{mg dm}^{-3}$	$\text{mg dm}^{-3}$	$\text{mg dm}^{-3}$	$\text{cmol dm}^{-3}$	$\text{cmol dm}^{-3}$		%		$\text{g dm}^{-3}$
APB1	3,10	1,20	0,40	84,40	2,60	1,16	1,40	7,60	9,41	19,53	43,54	19,00
APB2	4,43	2,30	0,60	92,36	5,16	1,96	0,40	2,80	5,93	52,78	11,31	19,00
APB3	4,06	1,56	0,43	86,83	4,13	1,0	1,40	7,56	9,79	22,78	38,60	20,66
APM1	4,37	1,62	0,62	200,7	7,8	2,37	0,57	3,4	6,16	45,01	17,77	17,75
APM2	3,87	0,72	0,25	92,37	5,17	1,87	1,20	6,02	7,23	17,20	49,41	18,00
APM3	5,27	2,25	0,35	62,75	6,00	1,22	0,02	1,80	4,56	59,32	0,97	16,50
CAP	3,86	1,26	0,46	78,23	2,20	1,13	1,53	7,36	9,30	21,98	44,02	19,00
FLO	4,77	1,75	0,72	44,92	1,5	0,95	0,20	2,67	5,26	46,87	10,88	22,25



**Figura 1 -** Mapa de localização e esquema do desenho de amostragem das áreas de coleta de solo nas três áreas de produção de Banana (APB1, APB2, APB3), três de Mandioca (APM1, APM2, APM3), Capoeira (CAP) e Floresta Plantada (FLO), no Projeto de Assentamento 26 de Março, Marabá, Pará, no ano de 2019



Em cada vaso foram colocadas cinco sementes de feijão caupi cultivar BRs 17 Gurguéia. Após sete dias do plantio, o desbaste foi realizado deixando apenas duas plantas por vaso. As plantas foram regadas periodicamente, de forma manual, com auxílio de um Becker.

Após 35 dias da emergência, as plantas foram colhidas para as determinações do número de nódulos (NN) e matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). As raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente para posteriormente serem retirados os nódulos com auxílio de uma pinça, sendo os nódulos conservados em sílica gel. Foi usada uma estufa de circulação de ar forçada a 65 °C para determinação da matéria seca da parte aérea e da raiz, até atingir peso constante.

Os dados do número de nódulos e matéria seca da parte aérea foram submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de confiança, utilizando o *software* R livre versão 3.5.2.3. Apenas as médias de número de nódulos e a massa seca de raiz foram transformados para  $(x+1)^{0,5}$ .

Para realizar o isolamento, dez maiores nódulos de cada tratamento foram lavados em água corrente e armazenados em tubos contendo sílica gel. No isolamento, os nódulos foram reidratados em água destilada autoclavada e, posteriormente, esterilizados com álcool 95% (30 segundos), hipoclorito de sódio 2% (2 minutos) (Hungria e Araújo, 1994) e em seguida, submetidos a lavagens sucessivas em água destilada estéril.

Em seguida, foram macerados em placas contendo meio de cultura sólido à base de manitol-extrato de levedura (YMA) (Fred e Waksman, 1928) com corante azul de bromotimol, sendo o material espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas.

A caracterização morfológica foi realizada em meio sólido YMA com o indicador ácido básico azul de bromotimol (Fred e Waksman, 1928). Os isolados foram caracterizados através dos seguintes parâmetros: 1) Forma da colônia: punctiforme; circular; irregular; filamentosa; 2) Elevação da colônia: plana, lenticular, convexa, pulvinada; 3) Borda da colônia: lisa rugosa, papilada (Melloni *et al.*, 2006).

A caracterização fisiológica também foi realizada em meio YMA (Fred e Waksman, 1928) indicador azul de bromotimol, considerando os parâmetros: 1) tempo de crescimento: muito rápido (1 dia), rápido (2 a 3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 15 dias) (Martins *et al.*, 1997); 2) formação de ácidos e álcalis (ácida, neutra, alcalina); 3) volume do muco (abundante, moderada, pouco escassa); 4) elasticidade do muco (gomosa, viscosa, seca); 5) Cromogenia ou Pigmentação da colônia (amarela, branca, creme, incolor) (Melloni *et al.*, 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nodulação do feijão caupi cultivado em condições controladas, em solo de diferentes áreas, é indicativo da ocorrência de rizóbios. Não há relatos de histórico de inoculação de rizóbios nesta cultura na região. Portanto, as bactérias que induziram a nodulação do feijão caupi são de comunidades nativas. Da mesma forma, a variação na nodulação e a resposta do caupi, sob influência dos diferentes sistemas de uso do solo e dos manejos estudados, evidenciam a natureza da composição e a afinidade das comunidades de rizóbios suportadas por cada área.

A avaliação do NN é um dos critérios que faz parte do protocolo de avaliação da eficiência simbiótica entre rizóbios e leguminosas. Porém, para o feijão caupi, não existem informações conclusivas sobre o número mínimo de nódulos necessários para garantir bom desempenho da FBN (Melo e Zilli, 2009), como é observado para a cultura da soja que indica como suficientes 15 a 20 nódulos na coroa da raiz principal (Hungria e Bohrer, 2000). No entanto, estudos com a cultivar BR 17 Gurguéia indicaram que a capacidade de inoculação dela é maior em relação a outros genótipos de feijão caupi de origem brasileira, nigeriana e norte-americana (Xavier *et al.*, 2006). Melo e Zilli (2009) também relatam maior capacidade de inoculação para essa cultivar.

O número de nódulos encontrados no presente estudo variou de 1,22 a 53,55 planta<sup>-1</sup> para os tratamentos APB1 e APM3, respectivamente. Ferreira *et al.* (2018), em condições de campo com plantas de feijão caupi na fase de pré-florescimento, no município de Marabá, Pará, encontraram uma média de 20 NN planta<sup>-1</sup>. Já Cavalcante *et al.* (2017)

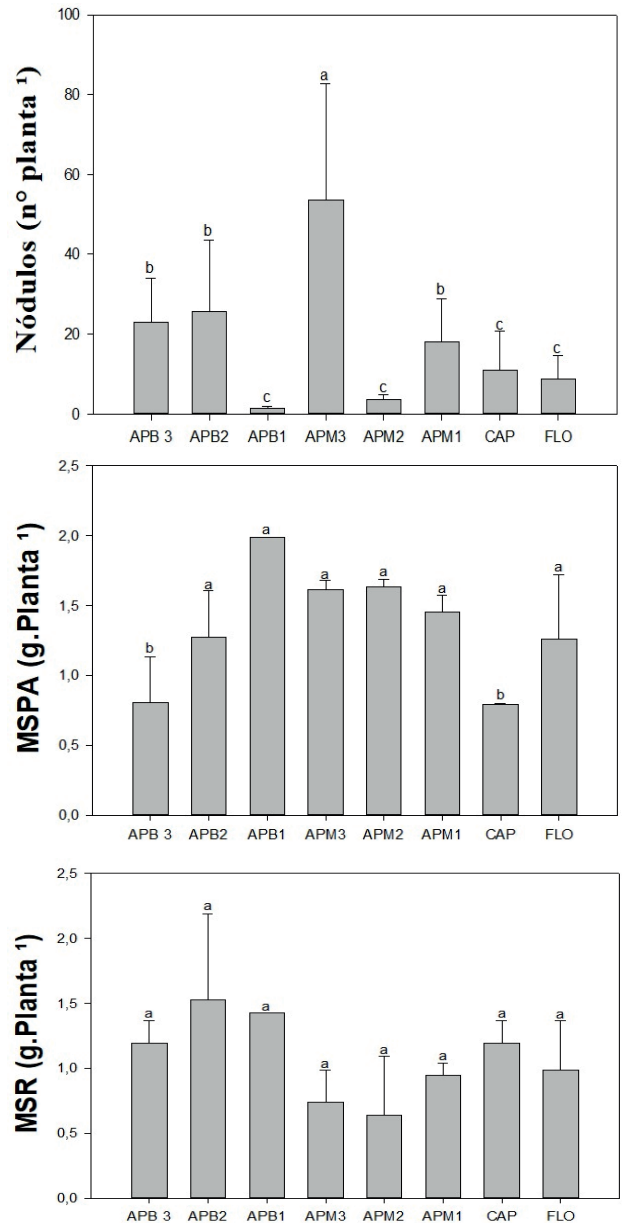
encontraram uma média de 25,80 NN planta<sup>-1</sup> em feijão cultivado sem inoculante, com experimento em campo no município de Bananeiras, Paraíba, Brasil. Esses resultados foram referentes ao comportamento da nodulação do feijão caupi sob diferentes condições.

O tratamento APM3 foi o que apresentou maior número de nódulos. Este resultado pode estar relacionado não só com a população nativa, mas também com as características de fertilidade deste solo (Quadro 2). O solo que constitui o tratamento APM3 apresenta o maior pH, concentração de P e saturação por base. As menores médias para a referida variável (APB1, APM2, CAP e FLO) foram obtidas em plantas cultivadas em solos oriundos com pH inferior a 4, com exceção da área de Floresta (FLO), que apresenta pH 4,77 e menor concentração de P. Desta forma, acredita-se que a acidez e o teor de P foram os fatores mais limitantes para formação de nódulos por estirpes nativas nessas áreas.

O P é um nutriente importante para o estabelecimento de nodulação, pois aumenta o número de pelos radiculares, proporcionando mais sítios de infecção para as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (Okeleye e Okelana, 1997). Além disso, a eficiência do processo de fixação do N<sub>2</sub> é dependente da disponibilidade de P devido à sua participação no processo simbiótico (Burity *et al.*, 2000). Othman *et al.* (1991) verificaram redução no número e na massa seca de nódulos, em feijão caupi, sob níveis baixos de P no solo. Igualmente, Okeleye e Okelana (1997) demonstraram aumento significativo na nodulação do feijão caupi em doses crescentes de P.

A menor produção de matéria seca da parte aérea do feijão caupi foi obtida nos tratamentos APB2 e CAP, com 0,8 e 0,79 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente. Nas demais áreas, não houve diferença significativa, sendo que a maior média foi de 1,98 g planta<sup>-1</sup>. Melo e Zilli (2009), cultivando feijão caupi cultivar BRs 17 Gurguéia, encontraram para a massa seca da parte aérea aos 35 dias após a emergência uma média de 0,2 g planta<sup>-1</sup> nos tratamentos com nodulação por estirpes nativas. Já para as plantas inoculadas e para as que receberam fertilizante nitrogenado obtiveram-se para a massa seca da parte aérea valores médios de 10,8 e 8,2 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente.

A massa seca de raiz variou de 0,63 a 1,52 g planta<sup>-1</sup>. Contudo, não se verificou diferença entre os tratamentos (Figura 2). Reis *et al.* (2017), estudando inoculantes alternativos no feijão caupi, encontraram média de 1,67 g em plantas que não receberam tratamento.



**Figura 2** - Avaliação do número (NN), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) de feijão caupi cultivados em solo de três áreas de produção de Banana (APB1, APB2, APB3), três de Mandioca (APM1, APM2, APM3), Capoeira (CAP) e Floresta (FLO), no Projeto de Assentamento 26 de Março, Marabá, Pará. Médias seguidas de letras diferentes dentro das colunas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) teste Scott Knott.

Os tratamentos CAP e APM3 foram os únicos que apresentaram correlação entre as variáveis NN, MSPA e MSR. Sendo que no tratamento CAP e APM3 foram encontradas as menores e as maiores médias, respectivamente, para as variáveis relacionadas. Essa correlação pode ser explicada pela fertilidade do solo (Quadro 2) e pela eficiência das populações de BNL nativas. Para Silva *et al.* (2010), a disponibilidade de nutrientes está entre os principais fatores que influenciam a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Foram obtidos um total de 53 estirpes: sob cultivo de banana (16 estirpes), mandioca (20 estirpes), áreas de capoeira (8 estirpes) e floresta plantada (9 estirpes), entre as quais foram encontradas uma grande variedade de estirpes com distintas características fenotípicas (Figura 2). Moreira *et al.* (1998) destacam que as principais características a indicar a presença de diferentes gêneros de BNLs são o tempo de crescimento e a modificação do pH do meio de cultura.

Morfologicamente, todas as estirpes exibiram colônias circulares, com predominância de elevação planas, com bordas inteiras. Apenas uma estirpe oriunda da área de capoeira apresentou elevação convexa (Figura 3).

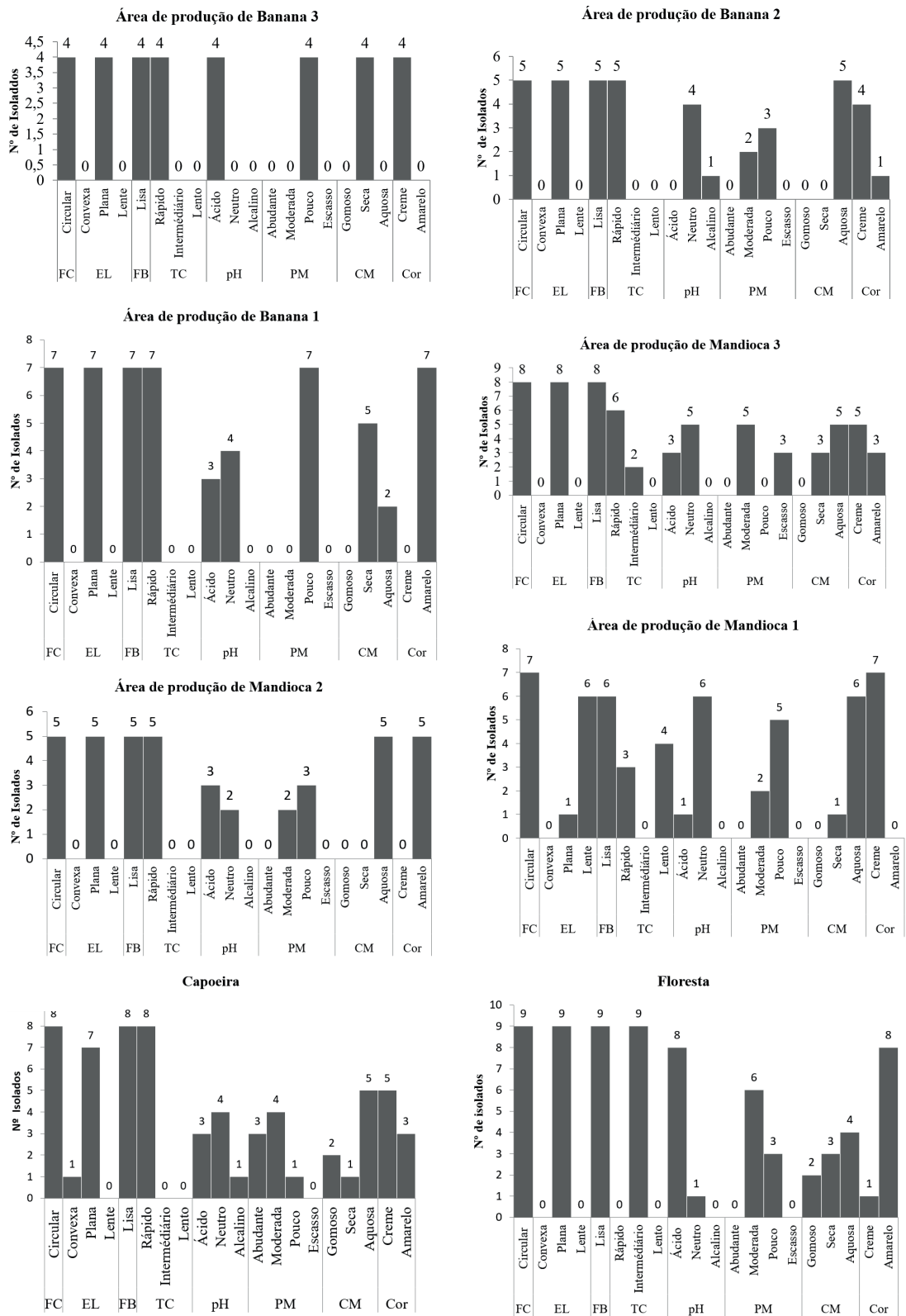
Quanto à caracterização fenotípica das estirpes nodulíferas através da morfologia cultural das colônias, verificou-se que 88,67% das bactérias apresentaram crescimento rápido, 5,66% intermediário e 5,66% lento (Figura 3). A presença de estirpes nodulíferas que apresentam crescimento rápido é comum em regiões com limitações de umidade e de altas temperaturas. Esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca do que as de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em curto espaço de tempo úmido, o que explicaria sua maior frequência nos solos das regiões semi-áridas (Santos *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2009). O presente trabalho foi realizado numa zona com elevada umidade, característica típica da região amazônica. No entanto, com um período de estiagem aproximadamente de seis meses, o que pode justificar o elevado número de estirpes de crescimento rápido. Também a prática de corte e de queima adotado pelo sistema de manejo das áreas sob produção de mandioca e de banana, proporcionam condições de estresses.

No que diz respeito à acidificação do meio de cultivo proporcionado pelas estirpes, Tan e Broughton (1981) sugerem que essa alteração do pH no meio de cultivo é promovida pela utilização preferencial das estirpes de crescimento rápido pelos açúcares presentes no meio de cultura e pela excreção de ácidos orgânicos após o consumo desse açúcar. No presente estudo, quanto à alteração do pH do meio, 47,16 % apresentaram reação ácida, 54,94 % neutra e 1,88% alcalina em meio YMA acrescido de azul de bromotimol (Figura 3).

O pH é um dos atributos edáficos que limita a presença de microrganismos no solo (Brockwell *et al.*, 1991). Figueiredo *et al.* (1996) verificaram que a ocorrência de rizóbio de crescimento rápido ou lento está relacionada com o pH do solo. Giongo *et al.* (2007), avaliando fatores ambientais do solo que afetavam a diversidade de populações de *Bradyrhizobium* spp., isolados de nódulos de soja, observaram que o pH do solo foi a principal característica que afetou a diversidade das populações, e que a menor diversidade foi encontrada nos solos com pH mais ácido. Essa característica está relacionada com os resultados obtidos neste trabalho, em que os isolados que apresentaram reação ácida foram isolados de áreas com pH variando de 3,10 a 5,27 (Quadro 2).

Outra evidência de adaptação é a produção de muco como um mecanismo de adaptação e sobrevivência a condições ambientais adversas (Teixeira *et al.*, 2010; Araújo e Gualter, 2017; Almeida *et al.*, 2018; Amorim *et al.*, 2019), o que reforça o efeito nos resultados encontrados nas diferentes áreas estudadas em virtude dos sistemas de manejo e uso: do total de 53 estirpes analisadas, 43 apresentaram produção moderada de muco, 5 abundante e 1 muito abundante.

A produção de muco pode ser associada à habilidade de crescimento rápido apresentada pelo total de estirpes. Dentre os gêneros que apresentaram estas características fisiológicas estão *Rhizobium* (Hungria *et al.*, 2016), *Sinorhizobium* (Matsubara e Zúñiga-Dávila, 2015), *Allorhizobium*, e *Mesorhizobium* (Marchetti *et al.*, 2017). A diversidade cultural encontrada no presente estudo demonstra a resiliência das bactérias diante das modificações implementadas pelos diferentes sistemas de cultivo de mandioca e de banana.



**Figura 3** - Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios noduladores de feijão caupi, oriundos de solo sob cultivo de mandioca, banana e áreas de capoeira e floresta no Projeto de Assentamento de 26 de Março, Marabá, Pará. FC (forma da colônia); EL (Elevação a borda); FB (forma da borda); TC (Tempo de Crescimento); pH (formação de ácidos e álcalis); PM (produção de muco); CM (consistência do muco); Cor.



Essa diversidade cultural encontrada comprova o caráter promíscuo do feijão caupi em relação à nodulação, corroborando resultados encontrados por outros autores (Melloni *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2018). Na literatura há relatos da nodulação pelos gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium* (Zilli *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2012) e por outros gêneros (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* e *Paenibacillus*), os quais, apesar de serem abundantes no solo e serem reconhecidamente eficientes em promover o crescimento vegetal através de outros processos diferentes da FBN, não são reconhecidos como nodulando leguminosas (Kan *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Shiraishi *et al.*, 2010; Marra *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013). Segundo Kan *et al.* (2007) essas bactérias, possivelmente, penetram no tecido vegetal juntamente com as nodulíferas durante a infecção e a formação dos nódulos. Porém, algumas bactérias endofíticas de

nódulos poderão evoluir para bactérias simbióticas por meio da transferência horizontal de genes simbióticos (Shiraishi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008).

## CONCLUSÕES

A nodulação ocorreu em todos os solos estudados no Projeto de Assentamento 26 de Março, em Marabá, Estado do Pará, Brasil, apresentando uma grande variação de número de nódulos e de produção de matéria seca da parte aérea. Os isolados apresentaram elevada diversidade cultural com características encontradas nos gêneros nodulíferos e não nodulíferos do feijão caupi. Estudos futuros sobre caracterização molecular e sobre a eficiência destes isolados na fixação biológica de N<sub>2</sub> em feijão caupi serão importantes para encontrar estirpes inoculantes e para estudos de promoção de crescimento por meio de outros mecanismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.L.G.; Alcântara, R.M.C.; Nóbrega, R.S.A.; Nóbrega, J.C.A.; Leite, L.F.C. & Silva, J.A.L. (2010) - Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 5, n. 3, p. 364-369. <https://doi.org/10.5039/agraria.v5i3a795>
- Almeida, A.M.M.; Mendes Filho, P.F.; Garcia, K.G.V.; Gomes, V.F.F. & Almeida, C.L. (2018) - Densidade, caracterização e eficiência de bactérias fixadoras de Nitrogênio em áreas de caatinga degradada. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, vol. 13, n. 1, p. 16-21. <https://doi.org/10.18378/rvads.v13i1.5282>
- Amorim, R.M.; Silva, A.V.C.R.; Antunes, J.E.L.; Oliveira, L.M.S. & Araújo, A.S.F. (2019) - Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) em solos de três estados do nordeste brasileiro. *Colloquium Agrariae*, vol. 15, n. 6, p. 11-20. <https://doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n6.a331>
- Araújo, C.L. & Gualter, R.M.R. (2017) - Caracterização morfofisiológica de bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Biotemas*, vol. 30, n. 1, p. 25-35. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2017v30n1p25>
- Brockwell, J.; Pilka, A.Y. & Holliday, R.A. (1991) - Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 31, n. 2, p. 211-219. <https://doi.org/10.1071/EA9910211>
- Burity, H.A.; Lyra, M.C.C.P.; Souza, E.S.; Mergulhão, A.C.E.S. & Silva, M.R.L.B. (2000) - Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 35, n. 4, p. 801-807. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000000400018>
- Castro, A.R.C. & Watrin, O.S. (2013) - Análise espacial de áreas com restrição legal de uso do solo em projeto de assentamento no sudeste paraense. *Geografia Ensino & Pesquisa*, vol. 17, n. 2, p. 157-166. <https://doi.org/10.5902/2236499410779>
- Cavalcante, A.C.P.; Cavalcante, A.G.; Diniz Neto, M.A.; Matos, B.F.; Diniz, B.L.M.T.; & Bertino, A.M.P. (2017) - Inoculação das cultivares locais de feijão-caupi com estirpes de rizóbio. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, vol. 60, n. 1, p. 38-44. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2170>
- Costa, E.M.; Nóbrega, R.S.A.; Carvalho, F.; Trochmann, A.; Ferreira, L.V.M. & Moreira, F.M.S. (2013) - Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 48, n. 9, p. 1275-1284. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>
- Dabessa, A.; Abebe, Z. & Bekele, S. (2018) - Limitation sand strategiest oenhance biological nitrogen fixation in sub-humidtropics of Western Ethiopia. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, vol. 10, n. 7, p. 122-131. <https://doi.org/10.5897/JABSD2018.0318>

- Ferreira, L.V.M.; Brito, E.A.S.; Santos, E.L. & Franco, M.R.B. (2018) - Ocorrência e eficiência de populações de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijão-caupi em Marabá, PA. *Cadernos de Agroecologia*, vol. 13, n. 1.
- Figueiredo, M.V.B.; Stamford, N.P.; Medeiros, R. & Santos, C.E.R.S. (1996) - Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em Latossolo amarelo com e sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 20, n. 1, p. 49-54.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. (1928) - *Laboratory Manual Of General Microbiology*. New York, McGraw-Hill Book Company, 143 p.
- Gama, J.R.N.F.; Valente, M.A.; Oliveira Júnior, R.C.; Cravo, M.S.; Carvalho, E.J.M. & Rodrigues, T.E. (2020) - Solos do Estado do Pará. In: Brasil, E.C.; Cravo, M.S. & Viégas, I.J.M. (Eds.) - *Recomendações de adubação e calagem para o Estado Pará*. Belém, Embrapa Amazônia Oriental. p. 25-46.
- Giongo, A.; Passaglia, L.M.P.; Freire, J.R.J. & Sá, E.L.S. (2007) - Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 43, p. 593-598. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0128-z>
- Guimarães, A.A.; Jaramillo, P.M.D.; Nóbrega, R.S.A.; Florestino, L.A.; Silva, K.B. & Moreira, F.M.S. (2012) - Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, n. 18, p. 6726-6733. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>
- Hungria, M. & Araújo, R. S. (1994) - *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, EMBRAPA, 542 p.
- Hungria, M. & Bohrer, T.R.J.V. (2000) - Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 31, p. 45-52. <https://doi.org/10.1007/s003740050622>
- Hungria, M.; O'Hara, G.; Zilli, J.E.; Araújo, R.; Deaker, R. & Howieson, J. (2016) - Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson, J.G. & Dilworth, M.J. (Eds.) - *Working with rhizobia*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), p. 39-60. [cit. 2019-03-21] <http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/34579>
- Kan, F.L.; Chen, Z.Y.; Wang, E.T.; Tian, C.F.; Sui, X.H. & Chen, W.X. (2007) - Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, vol. 188, p. 103-115. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3>
- Li, J.H.; Wang, E.T.; Chen, W.F. & Chen, W.X. (2008) - Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, n. 1, p. 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.014>
- Marchetti, M.M.; Santos, J.C.P. & Baratto, C.M. (2017) - Caracterização de bactérias em nódulos de leguminosas arbóreas de fragmentos da floresta ombrófila mista. *Scientia Agraria*, vol. 18, n. 4, p. 50-62. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i4.51383>
- Marra, L.M.; Soares, C.R.F.S.; Oliveira, S.M.; Ferreira, P.A.A.; Soares, B.L.; Carvalho, R.F.; Lima, J.M. & Moreira, F.M.S. (2012) - Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, vol. 357, p. 289-307. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1157-z>
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P. & Rumjanek, N.G. (1997) - *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio"*. Seropédica: Embrapa CNPAB, 14 p. (Série Embrapa CNPAB. Comunicado técnico, 19). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/623573/1/cot019.pdf>.
- Matsubara, M. & Zúñiga-Dávila, D. (2015) - Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. *Annals of Microbiology*, vol. 65, n. 3, p. 1803-1808. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1054-9>
- Medeiros, E.V.; Martins, C.M.; Lima, J.A.M.; Fernandes, Y.T.D.; Oliveira, V.R. & Borges, W.L. (2009) - Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum*, vol. 31, n. 3, p. 529-535. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i3.793>
- Melloni, R.; Moreira, F.M.S.; Nóbrega, R.S.A. & Siqueira, J.O. (2006) - Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupim [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 30, n. 2, p. 235-246. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000200005>

- Melo, S.R de & Zilli, J.E. (2009) - Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 44, n. 9, p. 1177-1183. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900016>
- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. (2006) - *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, 729 p.
- Moreira, F.M.S.; Haukka, K. & Young, J.P.W. (1998) - Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, vol. 7, n. 7, p. 889-895. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00411.x>
- Neves, E C.C. & Schmitz, H. (2018) - Meio século de oligarquia, uma década de assentamento: a herança da Fazenda Cabaceiras no Assentamento 26 de Março, em Marabá – PA. *Revista Sociedade e Agricultura*, vol. 26, n. 1, p.148-181. <https://doi.org/10.36920/esav26n1-7>
- Okeleye, K.A. & Okelana, M.A. (1997) - Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 67, p. 10-12.
- Oliveira-Longatti, S.M.; Marra, L.M.; Soares, B.L.; Bomfeti, C.A; Silva, K.; Ferreira, P.A.A. & Moreira, F.M.S. (2014) - Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, p. 1239-1250. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1547-2>
- Othman, W.M.W.; Lie, T.A.; Manetje, L.; Wassink, G.Y. & Wan-Othman, W.M. (1991) - Low level phosphorus supply affecting nodulation, N<sub>2</sub> fixation and growth cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, vol. 15, p. 67-74. <https://doi.org/10.1007/BF00014779>
- Reis, V.R.R.; Souza, L.R.S.S.; Vieira, G.L.S; Coelho, K.B.S; Carmo, A.S.F, Silva, M.R.M. (2018) - Crescimento vegetativo do feijão-caupi com inoculante alternativo. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, vol. 13, n. 4, p. 466-471.
- Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P.; Neves, M.C.P.; Runjanek, N.G.; Borges, W.L.; Bezerra, R.V. & Freitas, A.D.S. (2007) - Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 2, n. 4, p. 249-256.
- Shiraishi, A.; Matsushita, N. & Hougetsu, T. (2010) - Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. And the Beta proteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 33, n. 5, p. 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005>
- Silva, E.F.L; Araújo, A.S.F; Santos, V.B; Nunes, L.A.P & Carneiro, R.F.V. (2010) - Fixação biológica do N<sub>2</sub> em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. *Bioscience Journal*, vol. 26, n. 3, p. 394-402.
- Soares, A.L.L.; Pereira, J.P.A.R.; Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Lima, A.S.; Andrade, M.J.B. & Moreira, F.M.S. (2006) - Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I – Caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 30, n. 5, p. 795-802. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832006000500005>
- Soares, B.L.; Ferreira, P.A.A.; Oliveira-Longatti, S.M.D.; Marra, L.M.; Rufini, M.; Andrade, M.J.B.D. & Moreira, F.M.D.S. (2014) - Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. *Scientia Agricola*, vol. 71, n. 3, p. 171-180. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162014000300001>
- Tan, I.K.P. & Broughton, W.J. (1981) - Rhizobia in tropical legumes-xiii. biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 13, n. 5, p. 389-393. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(81\)90083-3](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(81)90083-3)
- Teixeira, F.C.P.; Borges, W.L.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. (2010) - Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 41, n. 1, p. 201-208. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100029>
- Vieira, I.C.G. & Proctor, J. (2007) - Mechanisms of plant regeneration during succession after shifting cultivation in eastern Amazonia. *Plant Ecology*, vol. 192, n. 2, p. 303-315. <http://dx.doi.org/10.1007/s11258-007-9327-4>
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Ribeiro, J.R.A. & Rumjanek, N.G. (2006) - Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Revista Caatinga*, vol. 19, n. 1, p. 25-33.
- Zhang, W.T.; Yang, J.K.; Yuan, T.Y. & Zhou, J.C. (2007) - Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 44, p. 201-210. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0196-8>
- Zilli, J.E.; Valicheski, R.R.; Rumjanek, N.G.; Simões-Araújo, J.L.; Freire Filho, F.R. & Neves, M.C.P. (2006) - Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do cerrado em feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 41, n. 5, p. 811-818. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000500013>