



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/PRODUÇÃO VEGETAL

Fixação biológica do nitrogênio e estresse oxidativo em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com lodo de curtume

Nayara de Jesus Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia, na área de concentração de Produção Vegetal.

**Teresina - PI
Março/2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/PRODUÇÃO VEGETAL

Fixação biológica do nitrogênio e estresse oxidativo em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com lodo de curtume

Nayara de Jesus Moraes
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues
Coorientadora: Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima

Teresina - PI
Março/2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Fixação biológica do nitrogênio e estresse oxidativo em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com lodo de curtume

Nayara de Jesus Moraes
Engenheira Agrônoma

Banca examinadora

Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues
Presidente/Orientadora

Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima
Examinadora

Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes
Examinadora

Dra. Vilma Maria dos Santos
Examinadora

Não é o desafio com que nos deparamos que
determina quem somos e o que estamos nos tornando,
mas a maneira com que respondemos ao desafio.
Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes.
Problemas para vencer, liberdade para provar.
E, enquanto acreditamos em nosso sonho,
nada é por acaso.

Henfil

A Deus sobre todas as coisas,
aos meus pais (Carlos e Alice), a minha irmã (Karla) e sobrinha (Isabella),
por toda força e compreensão para que eu chegasse até aqui.

DEDICO

Ao meu marido Tiago, companheiro de todas as horas e ao meu filho Bernardo,
espera de uma vida inteira e que está a caminho...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, provedor de todas as minhas vitórias, orientador e alicerce. Pai, obrigada por tudo;

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA);

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa;

A orientadora, professora Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues, pelos ensinamentos profissionais, éticos e humanos, pela amizade, puxões de orelha, pela paciente orientação e confiança;

A professora Dra. Aurenívia Bonifácio, pela experiência compartilhada, pela dedicação e bom humor sempre;

A professora Dra. Vilma Santos, pela disponibilidade e apoio na condução do experimento, indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Laboratório de Análise de Solo da Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Prof. Dr. Ademir Sérgio;

Ao amigo e companheiro de projeto Vicente Neto, com quem compartilhei momentos difíceis e construtivos durante o mestrado;

Aos amigos de Pós-graduação Rodrigo Brito, Raphael Lira, Sandra, Nilza Carvalho, Keyla Cosme, Myria Grazielle, Francisco Porto, que além da ajuda didática, tiveram a difícil missão de manter os ânimos e o humor sempre em alta;

Aos funcionários Sr. Vicente (Programa de Pós-Graduação), Sr. Tadeu (Coordenação do Curso de Agronomia), Hélio Lima (Laboratório de Solos) e 'Toinha' (Laboratório de Fitossanidade), pelo suporte ao projeto e disponibilidade sempre que solicitados;

Aos meus pais e irmã, vocês também tornaram este momento uma realidade, muito obrigada pela ajuda nunca negada e por toda a paciência;

Ao meu marido, Tiago, grande amigo e incentivador para que esse projeto se concluísse;

A cada um que fez parte desta história!

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| Lista de Tabelas | x |
| Lista de Figuras | xi |
| Lista de Anexos | xiii |
| RESUMO GERAL | xiv |
| GENERAL ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 16 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 O feijão-caupi | 17 |
| 2.2 Fixação biológica do nitrogênio | 18 |
| 2.3 Lodo de curtume compostado (LCC) | 19 |
| 2.4 Estresse oxidativo em espécies vegetais | 20 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 21 |
| | |
| CAPITULO I | 25 |
| Fixação biológica do nitrogênio em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com lodo de curtume compostado | 25 |
| | |
| Resumo | 26 |
| Abstract | 27 |
| 1. INTRODUÇÃO | 28 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 2.1 Descrição da área de estudo | 29 |
| 2.2 Características do solo utilizado | 29 |
| 2.3 Preparo do inoculante, inoculação e condução do experimento | 29 |
| 2.4 Variáveis analisadas | 31 |
| 2.5 Análise estatística | 31 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 4. CONCLUSÕES | 40 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| | |
| CAPITULO II | 43 |
| Estresse oxidativo em nódulos de feijão-caupi cultivado em solo com lodo de curtume compostado | 43 |
| | |
| Resumo | 44 |
| Abstract | 45 |
| 1. INTRODUÇÃO | 46 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 2.1 Descrições da área de estudo, instalação e condução do experimento | 47 |
| 2.2 Características do solo | 47 |
| 2.3 Preparo do inoculante, inoculação e condução do experimento | 47 |
| 2.3 Determinações bioquímicas | 49 |
| 2.4 Análises estatísticas | 50 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| 4. CONCLUSÕES | 56 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| ANEXOS | 59 |

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Características químicas do solo no sexto ano de aplicação de lodo de curtume compostado (LCC).29

Tabela 2. Eficiência relativa e eficácia de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado.....40

Capítulo II

Tabela 1. Características químicas do solo com aplicação de lodo de curtume compostado (LCC) utilizado no experimento.....47

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Esquema dos tratamentos após a inoculação das sementes com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. Os números 0, 5, 10 e 20 representam as doses de lodo de curtume compostado (LCC; t ha⁻¹). Os termos TN e TA representam as testemunhas nitrogenada e absoluta, respectivamente. 30

Figura 2. (A) Taxa de crescimento absoluto (coeficiente de variação =32,42%) em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). (B) Comparativo entre as plantas inoculadas e as testemunhas absoluta (TA) e nitrogenada (TN). 32

Figura 3. (A) Espessura (CV[#]=7,22%) e (B) comprimento (CV[#]=8,62%) da raiz de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). #Coeficiente de variação. 33

Figura 4. Parâmetros de (A) massa fresca (CV[#]=20,93%) e (B) massa seca da raiz (CV[#]=15,19%) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). #Coeficiente de variação. 34

Figura 5. Parâmetros de (A) massa fresca (CV[#]=16,10%) e (B) massa seca da parte aérea (CV[#]=15,58%) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos às doses 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). #Coeficiente de variação. 35

Figura 6. (A) Massa fresca (CV[#]=13,02%) e (B) seca (CV[#]=19,58%) de nódulos; (C) número de nódulos (CV[#]= 32,42%); e (D) nodulação específica (CV[#]= 12,56%) em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). #Coeficiente de variação. 36

Figura 7. Parâmetros de (A) eficiência de fixação de nitrogênio e (B) teor de nitrogênio em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). 39

Figura 8. Nitrogênio acumulado na parte aérea (A) e em nódulos (B) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). 39

Capítulo II

Figura 1. Esquema dos tratamentos após a inoculação das sementes com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. Os números 0, 5, 10 e 20 representam as doses de lodo de curtume compostado (LCC; t ha⁻¹). Os termos TN e TA representam as testemunhas nitrogenada e absoluta, respectivamente. 48

| | |
|---|----|
| Figura 2. Níveis de peróxido de hidrogênio em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B). | 51 |
| Figura 3. Concentração de leghemoglobina em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B). | 52 |
| Figura 4. Atividade da enzima catalase em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B). | 53 |
| Figura 5. Atividade de glutamato desidrogenase aminante em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B). | 54 |
| Figura 6. Atividade de sintetase de glutamina em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B). | 55 |
| Figura 7. Atividade de peroxidase em nódulos de feijão-caupi sem e com inoculação com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha ⁻¹ de LCC). | 55 |

Lista de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Vista geral do experimento..... | 60 |
| Anexo 2. (A) Emissão dos botões florais aos 40 dias após emergência; (B) início da floração aos 45 dias após emergência de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado..... | 61 |
| Anexo 3. Plantas de feijão-caupi aos 45 dias após emergência inoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3267) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado..... | 62 |

RESUMO GERAL

Moraes, Nayara de Jesus; Mestranda em Agronomia (Produção Vegetal); Universidade Federal do Piauí. Março/2015. **Fixação biológica do nitrogênio e estresse oxidativo em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com lodo de curtume.** Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues (Orientadora).

Os resíduos industriais, como o lodo de curtume compostado (LCC), podem ser utilizados na agricultura como uma alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados gerando, portanto, a redução de gastos e permitindo o seu uso sustentável. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a simbiose entre a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e plantas de feijão-caupi cv. Guaribas cultivadas em solo com aplicação de LCC. Para tal, foram implementados dois experimentos em condições de casa de vegetação com duas testemunhas (absoluta e nitrogenada). No primeiro experimento, objetivou-se avaliar parâmetros relacionados à FBN em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com aplicação de LCC. Neste, as plantas de feijão-caupi (inoculadas ou não) foram cultivadas em vasos contendo solo suplementado com 0, 5, 10 ou 20 t ha⁻¹ de LCC e, após 65 dias de experimento, avaliou-se: comprimento e espessura da raiz; matéria fresca da parte aérea, raízes e nódulos; matéria seca da parte aérea, raízes e nódulos; taxa de crescimento absoluto; número de nódulos; eficiência de fixação de nitrogênio; e nitrogênio acumulado. Observou-se que não houve interação significativa entre os níveis de LCC e a inoculação na maioria das variáveis analisadas. As plantas de feijão-caupi inoculadas e suplementadas com 0, 5 e 10 t ha⁻¹ de LCC apresentaram melhor desempenho, enquanto que para o número de nódulos, os melhores resultados foram obtidos nas doses de 0, 5 e 20 t ha⁻¹ de LCC. No segundo experimento, objetivou-se avaliar o metabolismo antioxidativo em nódulos de plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com aplicação de LCC em dois períodos distintos do ciclo da cultura (ponto de florescimento e de emissão de vagens). Após as coletas nos dois tempos estabelecidos, foram determinados os níveis de peróxido de hidrogênio; a concentração de leghemoglobina (LHb); e a atividades das enzimas catalase (CAT), desidrogenase do glutamato aminante (GDHa), sintetase de glutamina (GS) e peroxidase de fenóis (POX) nos nódulos de plantas de feijão-caupi. Os níveis de peróxido de hidrogênio nos nódulos de feijão-caupi, coletados no período de florescimento e na coleta das vagens, foram menores na dose de 10 t ha⁻¹ de LCC. Observou-se que a LHb nos nódulos foi incrementada nas plantas inoculadas e submetidas à 5 t ha⁻¹ de LCC (no florescimento) e à 20 t ha⁻¹ (na emissão de vagens). As enzimas CAT, GDHa, GS e POX foram diferentemente moduladas com relação às doses de LCC aplicadas, presença ou ausência do BR 3267 e épocas de coleta. Durante o florescimento, período onde a eficiência simbiótica é maior, a atividade das enzimas antioxidantes foi maior nas doses 5 e 10 t ha⁻¹ de LCC nas plantas inoculadas com BR 3267. Já na época de coleta das vagens, a atividade das enzimas CAT, GDHa e POX foram aumentadas nas plantas inoculadas com BR 3267. De modo geral, as respostas observadas parecem estar associadas com uma contribuição positiva da inoculação em estimular que as plantas degradem as substâncias tóxicas liberadas sob condições de estresse e, conseqüentemente, em manter o crescimento e desenvolvimento vegetal.

Palavras chave: *Vigna unguiculata*; Simbiose; Otimização da fixação; Atividade enzimática.

GENERAL ABSTRACT

Moraes, Nayara de Jesus; Master's Student in Agronomy (Plant Production); Federal University of Piauí. March/2015. **Biological nitrogen fixation and oxidative stress in cowpea plants cultivated in soil with tannery sludge.** Prof. PhD. Artenisa Cerqueira Rodrigues (Advisor).

Industrial waste, such as the tannery sludge composted (TSC) can be used in agriculture as an alternative to the use of nitrogen fertilizers generating therefore the reduction in costs and allowing for sustainable use. In this context, this study aimed to evaluate the symbiosis between the BR 3267 strain of *Bradyrhizobium* sp. and cowpea plants cv. Guaribas grown in soil with application of TSC. To this end, two experiments were implemented in greenhouse conditions with two controls (absoluted and nitrogenated). In the first experiment, aimed to evaluate parameters related to BNF in cowpea plants grown in soil with application of TSC. At this, cowpeas (inoculated or not) were grown in pots containing soil supplemented with 0, 5, 10 or 20 t ha⁻¹ TSC, and, after 65 days of experiment, were evaluated: length and thickness root; fresh matter of shoots, roots and nodules; dry matter of shoots, roots and nodules; absolute growth rate; number of nodules; nitrogen fixation efficiency; and accumulated nitrogen. There was no significant interaction between TSC levels and the inoculation in most of the variables analyzed. The cowpea plants inoculated and supplemented with 0; 5; and 10 t ha⁻¹ of TSC shows better performance, while to the number of nodules, the best results were obtained at doses of 0, 5 and 20 t ha⁻¹ of TSC. In the second experiment, aimed to evaluate the antioxidative metabolism in nodules of cowpea plants grown in soil with TSC application in two different periods of the crop cycle (at flowering and at pods emission point). After the collection in the two periods established, were determined the levels of hydrogen peroxide; the concentration of leghemoglobin (LHb); and the activities of catalase (CAT), glutamate dehydrogenase aminante (GDHa), glutamine synthetase (GS) and phenols peroxidase (POX) in nodules of cowpea plants. Hydrogen peroxide levels in cowpea nodules collected at flowering and at pods emission were lower at 10 t ha⁻¹ of TSC. It was observed that the LHb in nodules was increased in the inoculated plants and submitted to 5 t ha⁻¹ of TSC (at flowering) and to 20 t ha⁻¹ (at emission pod). The CAT, GDHa, GS and POX enzymes were modulated differently in relation to TSC levels applied, presence or absence of BR 3267 and collect periods. During the flowering, period where the symbiotic efficiency is higher, the activity of antioxidant enzymes was upper at 5 and 10 t ha⁻¹ of TSC levels in plants inoculated with BR 3267. Already at the emission pods period, the activity of CAT, GDHa and POX enzymes were increased in plants inoculated with BR 3267. In general, the observed responses appear to be associated with a positive contribution of the inoculation in stimulate the plants to degrade the toxic substances released under stress conditions and, consequently, in maintain the plant growth and development.

Keywords: *Vigna unguiculata*; Symbiosis; Otimization of the fixation; enzymatic activity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do feijão-caupi tem sido caracterizada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil como de baixo aporte tecnológico (FREIRE FILHO, 2011), com produtividade média de 525 kg ha⁻¹ e produção de 822 mil toneladas com destaque para a participação do Nordeste, com 84% da área plantada e 68% da produção nacional (CONAC, 2013). A produção pode ser incrementada através do uso de tecnologias de baixo custo, destacando entre elas, o uso de inoculantes de rizóbios eficientes que demonstram impactos positivos no âmbito econômico ambiental (ARAÚJO et al., 2012).

O feijão-caupi apresenta capacidade de nodular na presença de várias espécies de bactérias do grupo dos rizóbios (ZILLI et al., 2009), pesquisas têm evidenciado ao longo dos anos, que algumas estirpes de rizóbio, podem promover o aumento da produtividade através de uma simbiose efetiva e alta eficiência agrônômica (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; FREITAS et al., 2012). O feijão-caupi vem sendo intensamente pesquisado, com destaque para estudos voltados para o melhoramento genético, o manejo da cultura e a fixação biológica de nitrogênio.

Para a fixação biológica de nitrogênio, diversos trabalhos de seleção de estirpes (ZILLI et al., 2011) e de novos veículos para formulação de inoculantes foram realizados, e os resultados obtidos auxiliaram na ampliação da área plantada e inoculada (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2012). A fixação biológica de nitrogênio além de apresentar baixo custo, reduz a emissão de gases que podem promover o efeito estufa e evita a contaminação dos recursos hídricos (PELEGRIN et al., 2009), pode fornecer, biologicamente, o nitrogênio necessário as leguminosas aumentando suas produtividades, e ainda promovendo uma economia de aproximadamente US\$ 720 milhões por ano (HUNGRIA et al., 2011).

Outra alternativa para obtenção de altas produções de feijão-caupi, além aplicação de fertilizantes nitrogenados, têm sido o uso de resíduos industriais, a aplicação de adubo de resíduos pode se equiparar ou superar os índices alcançados com a adubação mineral em relação à produtividade e, sobretudo, economia com fertilizantes nitrogenados (RIBEIRO; MELO, 2008). A dificuldade de descarte de resíduos industriais associada ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados faz com que seja de suma importância a busca de alternativas econômicas para o uso e destino destes resíduos (SOUZA, 2009). Vale ressaltar que o lodo de curtume concentra elevada carga poluidora, como fenóis, sulfetos, sódio e principalmente, o

cromo (Cr), sendo estes compostos químicos não desejáveis do ponto de vista ambiental e agrícola (CAVALLET; SELBACH, 2008).

Os níveis de metais pesados presentes em alguns tipos de resíduos industriais podem afetar o crescimento e o metabolismo das plantas e levar a uma drástica redução de produtividade. Uma das consequências principais da presença desses metais no interior da célula é a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem ocasionar danos oxidativos nos constituintes celulares, alterações na fotossíntese, elevação da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos e finalmente morte celular (SRIVASTAVA; DUBEY, 2011). A atividade das enzimas antioxidantes atua como importante mecanismo de defesa ao combate de lesões oxidativas induzidas pela presença de metais pesados (SOARES et al., 2007). O aumento da atividade de enzimas antioxidativas em plantas tem sido relatado como relacionado com a exposição das plantas aos metais pesados e isto sugere que o sistema de defesa antioxidante se adapta a presença destes íons (MISHRA et al., 2011).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma das principais fontes de proteína vegetal contribuindo de forma significativa para a geração de renda no campo, é uma leguminosa de grande importância agrícola na região nordeste do Brasil e é capaz de aproveitar amplamente os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN), tem sido bastante utilizada em razão da sua capacidade de formar simbiose com diversas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, destacando-se por contribuírem com elevada entrada de nitrogênio no sistema solo-planta (GUIMARÃES et al., 2012).

No contexto de agricultura, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, eficazes e capazes de melhorar os níveis de produtividade dos cultivos de feijão-caupi, visto a importância desta leguminosa para subsistência de pequenos produtores (HAWERROTH et al., 2011). Atualmente, quatro estirpes são autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a inoculação do feijão-caupi, sendo: UFLA3-84 (SEMIA 6461), BR 3267 (SEMIA 6462), INPA3-11B (SEMIA 6463) e BR 3262 (SEMIA 6464) (BRASIL, 2011). Nos estados do Piauí e Maranhão, estudos avaliam estirpes de rizóbio (BR 3267) em associação às cultivares recomendadas para região,

indicando respostas diferenciadas, porém potenciais, quanto à habilidade dos genótipos em fixar o nitrogênio atmosférico (GUALTER et al., 2011).

2.2 Fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio é visto como elemento essencial para alcançar elevadas produções na agricultura, 80% deste nitrogênio encontra-se na atmosfera, em sua forma gasosa, indisponível aos vegetais, para o seu aproveitamento, é necessário a contribuição da relação simbiótica entre o sistema radicular e microrganismos do solo, realizada pelas bactérias diazotróficas ou fixadoras de nitrogênio, capazes de disponibilizar o nitrogênio em formas assimiláveis para as plantas. Nas leguminosas, a maior parte do nitrogênio atmosférico é incorporado pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), onde as bactérias através da simbiose formam nódulos fixadores de nitrogênio (MOREIRA et al., 2010; SHRIDHAR, 2012), local onde se processa a conversão do nitrogênio em amônia, posteriormente disponibilizada para as plantas (RODRIGUES et al., 2013).

A otimização da FBN e o conseqüente aumento de produtividade vegetal resulta de uma efetiva associação entre o microrganismo e o feijão-caupi (FERREIRA et al., 2011), vale ressaltar que a ação coordenada de inúmeras enzimas, principalmente as enzimas do metabolismo do carbono e nitrogênio, e aquelas que conferem proteção contra danos oxidativos, estão intimamente envolvidas com o processo de FBN (BECANA et al., 2010). A interação planta-microrganismo que ocorre na rizosfera, produz efeitos positivos nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e podem ter importantes implicações na agricultura (BALOTA et al., 2012). Quando a associação não é eficiente, isto se traduz em má formação do sistema radicular, alteração na fotossíntese, redução na translocação de fotoassimilados e na produção e alterações do crescimento (SHRIDHAR, 2012).

A seleção de linhagens rizobianas eficientes e competitivas é importante para uma maior eficiência da FBN (RODRIGUES et al., 2013). Em resposta a bactéria fixadora, as plantas fornecem carboidratos como fonte de energia para que o microrganismo complete, de forma satisfatória, seu ciclo de vida (BOMFETI et al., 2011). Desta forma, a seleção de estirpes elite tem mostrado que a FBN pode substituir com sucesso o uso de nitrogênio mineral no cultivo do feijão-caupi, mesmo em sistemas altamente tecnificados, visando produtividades superiores a 4000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2011), esta produtividade desejável para o feijão-caupi representa um incremento de quatro vezes a média nacional em relação à safra 2012/13 (BRASIL, 2013).

2.3 Lodo de curtume compostado (LCC)

A indústria de curtume contribui na economia brasileira com ativos anuais na ordem de US\$ 2,5 bilhões (CICB, 2014) e produz, anualmente, um milhão de toneladas de lodo de curtume (SANTOS et al., 2011). O resíduo é um grande armazenador de cromo (Cr) e sua acumulação no solo pode causar efeitos tóxicos sobre o ecossistema solo-planta (PATEL; PATRA, 2014). Além disso, o lodo de curtume contém sais que, quando associados ao Cr, podem afetar os processos bioquímicos do solo. Desta forma, tem-se utilizado os sistemas de compostagem na busca de tratamento para este resíduo e quando estes sistemas são efetivamente manejados ocorre a redução dos teores de elementos tóxicos, assim, o uso de lodo de curtume compostado na agricultura torna-se uma alternativa viável para reciclagem de resíduos orgânicos (SANTOS et al., 2011; GONÇALVES et al., 2014).

A relevante potencialidade econômica da indústria curtumeira, associada ao seu potencial poluidor, sobretudo, nas últimas décadas, vem estimulando a realização de pesquisas para o maior conhecimento de alternativas de descarte ou reaproveitamento desses resíduos, o seu uso agronômico é uma dessas alternativas, principalmente pela ação corretiva e capacidade de melhorar a fertilidade do solo, seu elevado teor de nutrientes e potencial de neutralização da acidez do solo tem sido avaliada em diferentes estudos, envolvendo variadas espécies vegetais. Tais estudos apontam para resultados agronômicos promissores, mostrando a viabilidade de uso do mesmo (BATISTA; ALOVISI, 2010; GONÇALVES et al., 2014).

O lodo de curtume é constituído de materiais orgânicos de origem animal e sais inorgânicos, alguns desses componentes são nutrientes para o crescimento e desenvolvimento das plantas e microrganismos do solo (MARTINES et al., 2006). O lodo de curtume concentra elevada carga poluidora, como fenóis, sulfetos, sódio e principalmente, o cromo (Cr), sendo estes compostos químicos não desejáveis do ponto de vista ambiental e agrícola (CAVALLET; SELBACH, 2008).

O cromo presente no lodo de curtume encontra-se na forma trivalente (Cr^{3+}), neste estado químico é considerado estável no solo, o Cr^{3+} pode torna-se tóxico, graças ao acúmulo constante, associado a dinâmica do elemento no solo, podendo oxidar-se à forma hexavalente (Cr^{6+}), esta é altamente solúvel e móvel, além de tóxica para as plantas, animais e seres humanos. A toxicidade do cromo nas plantas varia conforme o seu estado de oxidação e a sua capacidade de tolerância das diversas espécies (CASTILHOS et al., 2000).

O conteúdo de matéria orgânica presente no lodo de curtume pode contribuir para a redução da erosão do solo, aumento da produtividade das culturas e melhoria da diversidade

biomassa microbiana do solo (ARAÚJO et al., 2009), diminui a necessidade de fertilizações químicas, sobretudo as nitrogenadas, visto que este possui grande potencial para suprir nutricionalmente as culturas (RIBEIRO; MELLO, 2008). O uso agrícola de lodo de curtume compostado depende do conhecimento do seu grau de estabilidade, conteúdo químico e as formas dos componentes presentes, principalmente dos metais pesados, já que esses não são biodegradáveis e em elevadas concentrações tornam-se tóxicos (HAROUN et al., 2009).

2.4 Estresse oxidativo em espécies vegetais

A principal causa do estresse oxidativo nas espécies vegetais é o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo a fixação biológica de nitrogênio e a fotossíntese (BECANA et al., 2010). Os níveis de espécies reativas de oxigênio devem ser controlados através da ação de um mecanismo de defesa, composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

As espécies reativas de oxigênio são produzidas nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos através da respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração (FOYER; SHIGEOKA, 2011), são normalmente subprodutos de reações redox, podendo apresentar-se tanto como radicais livres, como na forma molecular de um não radical, geradas como resultado de excitação, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ou de sucessivas adições de elétrons ao O_2 , reduzindo-o ao radical aniônico superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila (OH^{\bullet}) (BHATTACHARJEE, 2010; KOVALCHUK, 2010).

As espécies reativas de oxigênio são formadas a partir do oxigênio molecular através de etapas de redução univalente, a primeira etapa na redução de O_2 produz radicais de vida relativamente curta, os superóxidos, esses não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram originados, dando continuidade ao processo, os superóxidos formam hidroxiperóxidos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos) e oxidam aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano, podendo também causar peroxidação de lipídeos no ambiente e nas membranas celulares (BREUSEGEM et al., 2001). A redução do oxigênio gera também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção, este é precursor do radical hidroxil (OH^{\bullet}) a última e mais reativa espécie a ser formada neste ciclo, é formada pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}) na reação de Fenton e tem alta afinidade por moléculas biológicas em seu sitio de produção. O

hidroxil, reage rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio apresenta uma meia-vida muito curta (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Fatores ambientais de estresse como níveis elevados de luminosidade, déficit hídrico, metais pesados, extremos de temperatura, radiação ultravioleta, poluição do ar, herbicidas, podem favorecer a produção das espécies reativas de oxigênio e também como resposta a estresses bióticos como o ataque de patógenos (MALLICK; RAI, 1999). Podem ser geradas com a destruição do sistema de transporte de elétrons durante situações de estresse, sobretudo, são subprodutos do metabolismo celular regular (BREUSEGEM et al., 2001).

A capacidade de acionar esses mecanismos de defesa pode prevenir o acúmulo dessas espécies reativas e o estresse oxidativo (SILVEIRA et al., 2011). Esses mecanismos são compostos por agentes enzimáticos e não enzimáticos distribuídos nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, mediando praticamente a maior parte das reações bioquímicas e catalisando reações químicas, entre elas podemos citar as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase, peroxidases, catalase e polifenoloxidase e os metabólitos antioxidantes ácido ascórbico, a glutatona, o α -tocoferol e os carotenoides. (KIM; KWAK, 2010; MYLONA; POLIDOROS, 2011; DINAKAR et al., 2012).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. L. G.; ALCANTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv. BR17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Agrária**, v. 5, p. 364 -369, 2010.
- ARAÚJO, A. S. F.; MELO, W. J.; SINGH, R. P. Municipal solid waste compost amendment in agricultural soil: changes in soil microbial biomass. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 9, p. 41- 49, 2009.
- ARAÚJO, A. S. F.; LEITE, L. F. C.; IWATA, B. F.; LIRA JÚNIOR, M. A.; XAVIER, G. R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Microbiological process in agroforestry systems: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 215-226, 2012.
- BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; SCHERER, A. Mycorrhizal effectiveness on physic nut as influenced by phosphate fertilization levels. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 23-32, 2012.
- BATISTA, M. M.; ALOVISI, A. M. T. Alterações de atributos químicos do solo e rendimento da cana soca pela utilização de lodo de curtume. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 13, n. 17, p. 387-396, 2010.
- BECANA, M.; MATAMOROS, M. A.; UDVARDI, M.; DALTON, D. A. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. **New Phytologist**, v. 188, p. 960-976, 2010.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 1-30.

BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. D. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 657-671, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

CASTILHOS, D. D.; COSTA, C. N.; PASSIANOTO, C. C.; LIMA, A. C. R.; LIMA, C. L. R.; MULLER, V. Efeitos da adição de cromo hexavalente no crescimento, nodulação e absorção de nutrientes em soja. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, 2000.

CASTILHOS, D.; VIDOR, C.; CASTILHOS, R. Atividade microbiana em solo suprido com lodo de curtume e Cr hexavalente. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, p. 71-76, 2000.

CAVALLET, L. E.; SELBACH, P. Populações microbianas em solo agrícola sob aplicações de lodo de curtume. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2863-2869, 2008.

CICB (Centro das Indústrias de Curtume do Brasil). **Informações Econômicas**. <http://www.cicb.org.br/?p=10817>. Acessado em 20 novembro, 2014.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Séries históricas**. 2013.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 1-7, 2011.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

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**, v. 11, p. 2945-2951, 2012.

FERREIRA, E. P. B.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. **Revista Caatinga**, v. 2, n. 4, p. 27-35, 2011.

FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; AGUIAR, F. L.; MOREIRA, F. M. S.; PACHECO, L. P. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, family farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, p. 153-160, 2013.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

FREIRE FILHO, F. R. **Feijão-caupi no Brasil**: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

- FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 109-114, 2012.
- GONÇALVES, I. C. R., ARAUJO, A. S. F., NUNES, L. A. P. L., MELO, W. J. Soil microbial biomass after two years of consecutive application of composted tannery sludge. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 36, p. 35-41, 2014.
- GUALTER, M. R. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORESTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen fixing bacterial isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 6726-6733, 2012.
- HAROUN, M.; IDRIS, A.; OMAR, S. Analysis of heavy metals during composting of the tannery sludge using physicochemical and spectroscopic techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 111-119, 2009.
- HAWERROTH, F. J.; CRESTANI, M.; SANTOS, J. C. P. Desempenho de cultivares de feijoeiro sob inoculação com *Rhizobium* e relação entre os caracteres componentes do rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 897-908, 2011.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo** (Documentos 325). Londrina: Embrapa Soja, 2011.
- KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 129-150.
- KOVALCHUK, I. Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 31-44.
- MALLICK, N.; RAI, L. C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.
- MARTINES, A. M.; ANDRADE, C. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curtume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1149-1155, 2006.
- MISHRA, S.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Arsenite treatment induces oxidative stress, up regulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 565-577, 2011.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- MYLONA, P. V.; POLIDOROS, A. N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Cap.6, p.101-128.
- PATEL, A., PATRA, D.D. Influence of heavy metal rich tannery sludge on soil enzymes vis-à-vis growth of *Tagetes minuta*, an essential oil bearing crop. **Chemosphere**, v. 112, p. 323-332, 2014.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.

RIBEIRO, E. M. P.; MELLO, P. B. **A utilização do adubo de resíduo de apara de couro como fonte de nitrogênio no solo agrícola com ganhos energéticos e ambientais.** In: XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Rio de Janeiro. 2008. 15p.

RODRIGUES, A. C.; BONIFACIO, A.; ANTUNES, J. E. L.; SILVEIRA, J. A. G., FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelation ship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 245-251, 2013.

SANTOS, J. A.; NUNES, L. A. P. L.; MELO, W. J.; ARAUJO, A. S. F. Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass of two different soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 146-151, 2011.

SHRIDHAR, B. S. Review: nitrogen-fixing microorganisms. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 1, p. 46-52, 2012.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 138-141, 2012.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.

SOUZA, M. R. F. **Uso do lodo de curtume como fonte de nutrientes em plantas forrageiras.** Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R. S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 110, p. 1-16, 2011.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazônica**, v. 39, p. 749-758, 2009.

ZILLI, J. E.; SILVA NETO, M. L.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.

CAPITULO I

**Fixação biológica do nitrogênio em plantas de feijão-caupi
cultivadas em solo com lodo de curtume compostado**

Resumo

O nitrogênio afeta significativamente a produtividade do feijoeiro, é um dos nutrientes mais limitantes à sua produção sendo o mais absorvido e extraído pelo feijoeiro. Sua presença ou ausência afeta a simbiose de várias formas, em excesso, pode reduzir a eficiência simbiótica, porém aplicado em pequenas quantidades, permite maior fixação biológica de nitrogênio (FBN) conseqüentemente um aumento no crescimento dos nódulos. Em contrapartida, teores muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica. A simbiose do feijão-caupi com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, garante melhor desenvolvimento vegetativo e produtivo, contribuindo para diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados. O objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros relacionados à FBN em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com aplicação de lodo de curtume compostado (LCC). O experimento foi executado em blocos casualizados em esquema fatorial 4 x 2 (quatro doses de LCC; inoculada ou não com BR 3267), com quatro repetições. As plantas de feijão-caupi inoculadas ou não foram cultivadas em vasos contendo solo suplementado com diferentes doses de LCC e, após 65 dias de experimento, avaliou-se: comprimento e espessura da raiz; matéria fresca e seca da parte aérea, raízes e nódulos; taxa de crescimento absoluto; número de nódulos; eficiência de fixação de nitrogênio; e nitrogênio acumulado. Observou-se, neste experimento, que as plantas de feijão-caupi inoculadas e suplementadas com 0, 5 e 10 t ha⁻¹ de LCC apresentaram bom desempenho em relação a variáveis de crescimento e número de nódulos. As plantas inoculadas com BR 3267 demonstraram ótima capacidade de fixar e fornecer o nitrogênio, mostrando que a interação entre o feijão-caupi e o rizóbio, mesmo na presença do LCC, é capaz de suprir as necessidades da planta em relação ao conteúdo de nitrogênio e realizar uma FBN efetiva.

Palavras-chave: Resíduos industriais, *Bradyrhizobium* sp., Inoculação.

Abstract

Nitrogen significantly affects the common bean yield, is one of the most limiting nutrient to its production being the most absorbed and extracted by the bean. Its presence or absence affects the symbiosis in various ways, in excess, can reduce the symbiotic efficiency, but applied in small amounts, allows greater biological nitrogen fixation (BNF) and, consequently, an increase in the nodules growth. In contrast, very low levels of nitrate in the soil may be limiting the symbiotic activity. Symbiosis of cowpea with atmospheric nitrogen fixing bacteria allows better vegetative and productive development, contributing to decreased use of nitrogen fertilizers. The aim of this study was to evaluate parameters related to BNF in cowpea plants grown in soil with application of tannery sludge composted (TSC). The experiment was performed in randomized blocks in a factorial 4 x 2 (four levels of TSC, inoculated or not with BR 3267), with four replications. The cowpea plants (inoculated or not) were grown in pots containing soil supplemented with different TSC levels, and, after 65 days of experiment, were evaluated: length and thickness of the root; fresh and dry weight of shoots, roots and nodules; absolute growth rate; number of nodules; nitrogen fixation efficiency; and accumulated nitrogen. It was observed, in this experiment, that cowpea plants inoculated and supplemented with 0, 5 and 10 t ha⁻¹ of TSC performed better performance in relation to growth variables and number of nodules. Plants inoculated with BR 3267 demonstrated great ability to fix and provide nitrogen, showing that the interaction between the cowpea and the rhizobia, even in the presence of TSC, is able to supply the necessity of the plants in relation to nitrogen content and conduct an effective BNF.

Keywords: Industrial residues, *Bradyrhizobium* sp., Inoculation.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio influencia diretamente no crescimento vegetativo da planta, desempenhando papel relevante na atividade fotossintética, influenciando a atividade da nitrogenase, enzima responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico em formas disponíveis para as plantas, devido sua importância estrutural nas moléculas de clorofila e consequente aumento de produtividade do feijão-caupi (NASCIMENTO et al., 2008), sua carência é considerada um fator negativo aos ecossistemas, ocasionando drásticas reduções nos processos de produção de biomassa, além de afetar a simbiose planta-microorganismos do solo (SILVA et al., 2011). Em excesso, o nitrogênio pode reduzir a eficiência simbiótica, porém, quando aplicado em pequenas quantidades, induz uma maior fixação biológica de nitrogênio (FBN). Quando teores de nitrogênio estão muito baixos no solo pode ocorrer a limitação da atividade simbiótica efetiva (MOURA et al., 2009).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), por meio da simbiose com bactérias, pode fixar o nitrogênio atmosférico (N₂) e garantir o melhor desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da cultura, contribuindo assim para uma considerável redução no uso de fertilizantes nitrogenados (CHAGAS JR et al., 2010). A constante busca por sustentabilidade nos sistemas agrícolas têm apresentado a FBN como alternativa viável para o uso de fertilizantes nitrogenados, podendo suplementá-los ou até mesmo substituí-los (HUNGRIA, 2011), quando eficiente, o feijão-caupi pode atingir altas produtividades. Segundo Zilli (2009), parece não existir diferença na produtividade em cultivos de feijão-caupi utilizando nitrogênio via adubação convencional e o nitrogênio oriundo da fixação simbiótica. Diante disso, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a FBN e a eficiência agrônômica de diferentes estipes de rizóbio na busca de reduzir os custos de produção e aumentar a produtividade do feijão-caupi (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; COSTA et al., 2011; GUALTER et al., 2011).

O presente estudo objetivou avaliar parâmetros relacionados à fixação biológica do nitrogênio em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp., em solo com seis anos de aplicações sucessivas de lodo de curtume compostado em diferentes concentrações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área de estudo

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação localizada entre as coordenadas 05°05'21" S e 42°48'07" W, que corresponde à uma área do campo experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí em Teresina-Piauí. O município de Teresina apresenta temperaturas mínimas e máximas de 23 °C e 36 °C, respectivamente, podendo ultrapassar os 40°C nos meses mais quentes. O clima da região é do tipo Tropical (Aw) segundo classificação de Köppen e as médias anuais de umidade relativa e precipitação são de 72,6% e 1.336 mm, respectivamente (BASTOS; ANDRADE JÚNIOR, 2008).

2.2 Características do solo utilizado

O solo utilizado no experimento foi coletado em uma área submetida à aplicação de lodo de curtume compostado em diferentes doses por seis anos consecutivos. Após a coleta, 3,8 kg de solo foram utilizados para encher os vasos utilizados no experimento. Para as testemunhas absoluta e nitrogenada (zero t ha⁻¹), utilizou-se o solo da uma área adjacente que não apresentou aporte de lodo de curtume compostado. O restante do solo foi coletado nas parcelas que receberam as doses de 5; 10; e 20 t ha⁻¹, separadamente. O lodo de curtume aplicado ao solo foi obtido no curtume Europa localizado no município de Teresina/PI e compostado no Centro de Ciências Agrárias. A área experimental apresentava histórico de cultivo de feijão-caupi e milho e foi previamente analisado (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas do solo no sexto ano de aplicação de lodo de curtume compostado (LCC).

| Doses de LCC ¹ | Características químicas do solo analisado | | | | | | | |
|---------------------------|--|--------------------------|--------------------------|-----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | pH (H ₂ O) | P (mg dm ⁻³) | K (mg dm ⁻³) | Na | Al (cmolc dm ⁻³) | Ca (cmolc dm ⁻³) | Mg (cmolc dm ⁻³) | Cr (t kg ⁻¹) |
| 0 | 6,2 | 3,31 | 42,3 | 1,0 | 0,07 | 0,77 | 0,10 | 4,730 |
| 5 | 7,0 | 7,95 | 51,0 | 1,1 | 0,07 | 1,51 | 0,16 | 61,18 |
| 10 | 7,3 | 11,20 | 49,5 | 1,2 | 0,06 | 1,32 | 0,19 | 65,23 |
| 20 | 8,1 | 18,60 | 58,5 | 1,2 | 0,06 | 1,61 | 0,48 | 253,49 |

¹Doses de LCC aplicadas em área experimental durante seis anos consecutivos. A dose zero (controle) não apresentou aporte de LCC.

2.3 Preparo do inoculante, inoculação e condução do experimento

A estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. utilizada no experimento foi cedida pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ). Inicialmente procedeu-se a purificação da estirpe

BR 3267 utilizando meio YMA (Agar, Manitol e Extrato de Levedura) com adição de vermelho Congo (indicador). Após a purificação, a estirpe BR 3267 foi multiplicada em tubos de cultivo contendo meio YMA (sem a presença do indicador). Para o preparo do inoculante, a estirpe BR 3267 foi repicada para frascos tipo Erlenmeyers contendo meio líquido YM (Manitol e Extrato de Levedura) e incubada em agitador rotatório (220 rpm; 28°C; 96 h).

Após o preparo do inoculante, procedeu-se a inoculação das sementes de feijão-caupi e a implementação dos tratamentos (Figura 1). Para a inoculação, adicionou-se 1,0 mL de meio de cultura YM contendo a estirpe BR 3267 na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. As sementes de feijão-caupi cv. BRS Guariba inoculadas foram semeadas em vasos contendo as seguintes doses de lodo de curtume compostado (LCC): zero (controle); 5; 10; e 20 t ha⁻¹. Implementou-se ainda duas testemunhas: a testemunha absoluta, sementes de feijão-caupi não inoculada e não suplementada com adubação mineral; e a testemunha nitrogenada, sementes de feijão-caupi não inoculada e suplementadas com (NH₄)₂SO₄ aos 7, 14 e 21 dias após o desbaste conforme as recomendações da análise de solo.

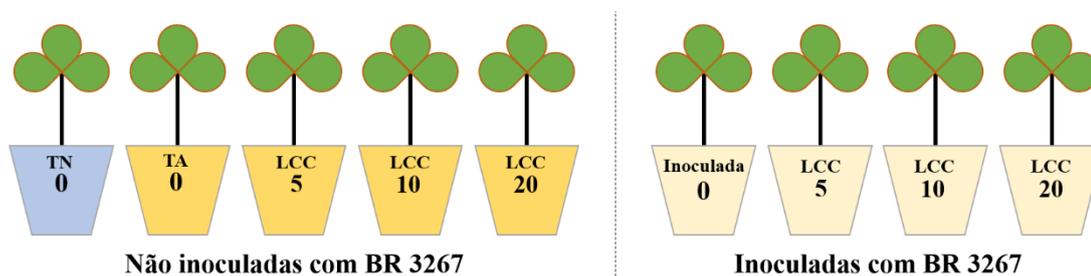


Figura 1. Esquema dos tratamentos após a inoculação das sementes com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. Os números 0, 5, 10 e 20 representam as doses de lodo de curtume compostado (LCC; t ha⁻¹). Os termos TN e TA representam as testemunhas nitrogenada e absoluta, respectivamente.

As sementes de feijão-caupi cv. BRS Guariba utilizadas no experimento foram cedidas pela Embrapa Meio Norte (Teresina/PI), escolhida por ser a mais utilizada na região e por ter ciclo de desenvolvimento de aproximadamente 70 dias. Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas de acordo com metodologia de Vincent (1970). Além disso, o solo foi adubado antes do plantio conforme recomendação da análise do solo. Durante a condução do experimento, as plantas de feijão-caupi foram irrigadas duas vezes por semana com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Silveira et al. (1998) e isenta de nitrogênio. As regas com água foram feitas conforme a necessidade da cultura. A coleta foi

realizada aos 65 dias após emergência e separou-se as raízes, os nódulos e a parte aérea (folhas) para as posteriores análises.

2.4 Variáveis analisadas

Foram avaliados os seguintes caracteres nas plantas de feijão-caupi: taxa de crescimento absoluto (BENINCASA, 2003); espessura e comprimento da raiz; matéria fresca e seca da parte aérea, raízes e nódulos; número de nódulos; eficiência da fixação de nitrogênio (GULDEN; VESSEY, 1998); teor de nitrogênio na matéria seca da parte aérea (Teor de N) (TEDESCO et al., 1995); nitrogênio acumulado na parte aérea (N_{acPA}) e nos nódulos (N_{acNod}); nodulação específica; eficiência relativa e eficácia (FARIA; FRANCO, 2002).

2.5 Análise estatística

O experimento foi executado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 4 x 2 (quatro doses de LCC; inoculada ou não com BR 3267) com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico ASSISTAT e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o teste de normalidade, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de crescimento absoluto (TCA) é uma medida utilizada para determinar a velocidade média de crescimento da planta ao longo do período de observação (BENINCASA, 2003). Neste estudo, os resultados encontrados demonstram que não houve interação significativa para TCA entre as plantas inoculadas, refletindo um não favorecimento do crescimento das plantas de feijão-caupi por parte da interação BR 3267 e lodo de curtume compostado (Figura 2). O reduzido crescimento pode ser reflexo da ação de fatores externos como umidade, temperatura e radiação solar, visto que o experimento foi desenvolvido em período com elevadas temperaturas, podendo ter havido uma redução da sua atividade fotossintética, com efeitos negativos no crescimento das plantas, corroborando com a afirmação de que a TCA está intimamente relacionada com a fotossíntese e que sofre influência direta da temperatura e outros fatores externos (BENINCASA, 2003).

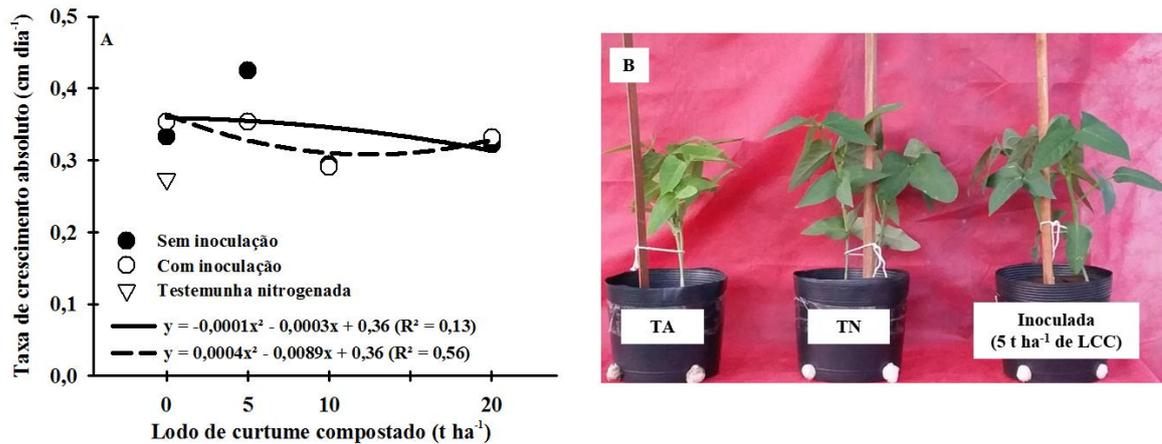


Figura 2. (A) Taxa de crescimento absoluto (coeficiente de variação =32,42%) em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). (B) Comparativo entre as plantas inoculadas e as testemunhas absoluta (TA) e nitrogenada (TN).

A avaliação do crescimento e desenvolvimento das plantas é muito complexa por envolver o efeito de fatores externos, bióticos e abióticos, sobre os processos fisiológicos nas plantas (DEY et al., 2004). Os valores médios de espessura de raiz apresentaram diferença significativa entre os tratamentos que receberam inoculação com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 3A). Os maiores valores de espessura de raiz (12,2 cm) foram observados na dose 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado nas plantas sem inoculação e os menores valores (9,5 cm) foram encontrados em plantas inoculadas com BR 3267 e cultivadas em solo com aplicação de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). Este resultado mostra que não houve incremento por parte da associação de lodo de curtume compostado e a inoculação.

Não foi possível identificar diferença significativa entre os diferentes tratamentos para o comprimento de raiz (Figura 3B), sendo que a testemunha nitrogenada apresentou valores superiores (27,5 cm) aos tratamentos com e sem inoculação, sugerindo que o acréscimo de lodo de curtume compostado não incrementou o conteúdo de comprimento de raiz na maioria dos tratamentos (Figura 3B), este comportamento pode ser atribuído a adubação mineral que foi realizada no pré-plantio associada a ação dos rizóbios nativos.

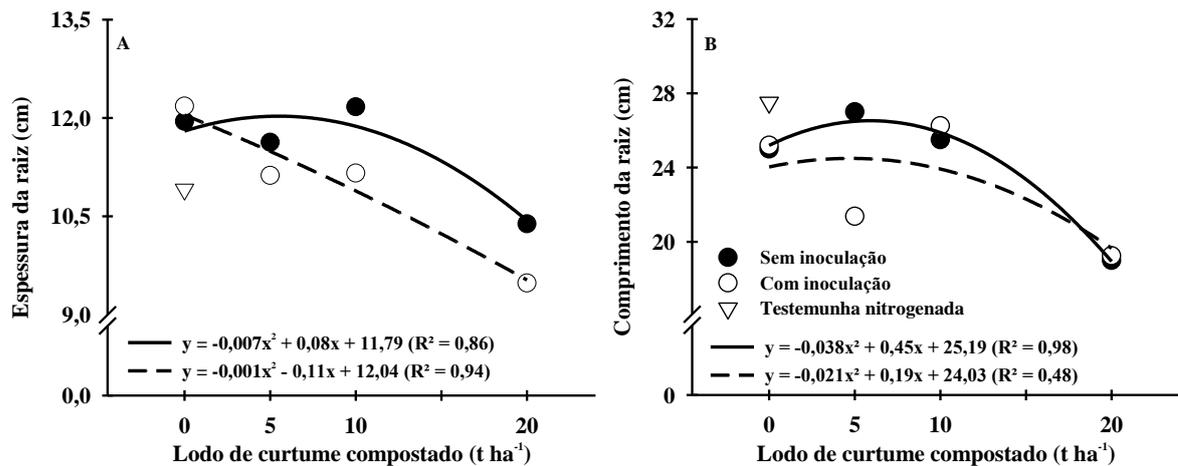


Figura 3. (A) Espessura ($CV^{\#}=7,22\%$) e (B) comprimento ($CV^{\#}=8,62\%$) da raiz de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). [#]Coefficiente de variação.

Para a variável massa fresca de raiz, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos inoculados, nas doses 5 e 10 t ha⁻¹, demonstrando que não houve influência significativa da inoculação com BR 3267 e lodo de curtume compostado no conteúdo de massa fresca de raiz. A Figura 4A mostra que houve incremento nos valores de massa fresca de raiz nas plantas de feijão-caupi inoculados ou não com BR 3267. As plantas de feijão-caupi não inoculadas com BR 3267 se sobressaíram sobre aquelas que foram inoculadas independente do aumento das doses de lodo de curtume compostado.

É possível observar, ainda, que plantas de feijão-caupi não inoculadas e cultivadas no solo com aplicação de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado apresentaram maior valor médio de massa fresca de raiz (54,9 g vaso⁻¹), comportamento que se repetiu nas plantas inoculadas com BR 3267, apresentando maior conteúdo de massa fresca de raiz na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 4A). Esse desempenho superior das plantas não inoculadas pode ser atribuído ao melhor desempenho dos rizóbios nativos neste tratamento e a uma maior eficiência destas plantas em utilizar os nutrientes disponíveis no lodo de curtume compostado (HUNGRIA et al., 2003). Os resultados de massa fresca de raiz (MFR) e de massa seca da raiz (MSR) podem ser utilizados no cálculo da relação MFR/MSR, que pode informar sobre o teor de água nos tecidos, ou seja, que seria um indicativo do “status” de água na planta (PEIXOTO, 2010).

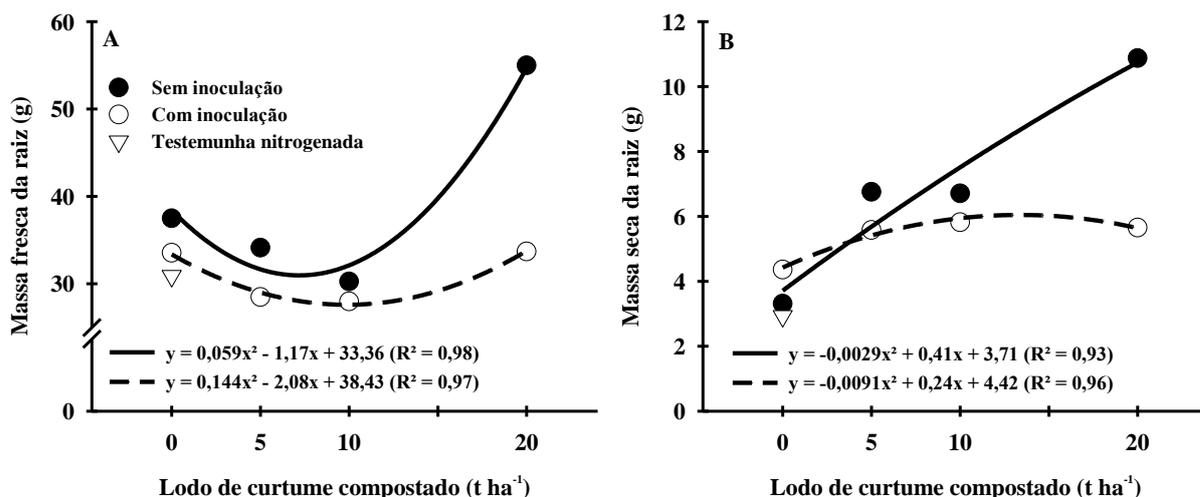


Figura 4. Parâmetros de (A) massa fresca ($CV^{\#}=20,93\%$) e (B) massa seca da raiz ($CV^{\#}=15,19\%$) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). [#]Coefficiente de variação.

Em relação à massa seca da raiz, é possível observar na Figura 4B que os tratamentos apresentaram comportamento semelhante. A massa seca da raiz foi incrementada de acordo com o aumento nas doses de lodo de curtume compostado presente no solo em plantas não inoculadas e estas apresentaram menor valor de massa seca da raiz (6,7 g vaso⁻¹) na dose de 10 t ha⁻¹ e maior valor (10,9 g vaso⁻¹) na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado. As plantas que receberam a inoculação também apresentaram a mesma tendência de crescimento, no entanto, esse acréscimo foi menor (5,6 g vaso⁻¹ e 5,7 g vaso⁻¹ para as doses de 5 e 20 t ha⁻¹, respectivamente). Estes resultados evidenciam o efeito positivo que o lodo de curtume compostado aplicado ao solo pode promover ao desenvolvimento de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. De acordo com Benincasa (2003), a distribuição de massa seca da planta permite discutir a translocação de fotoassimilados, e em muitos casos facilitam a compreensão da resposta das plantas em termos de produtividade.

Neste estudo, as plantas dos tratamentos inoculados ou não com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp., nas diferentes doses de lodo de curtume compostado apresentaram comportamento semelhante quando avaliados o conteúdo de massa fresca da parte aérea de plantas de feijão-caupi (Figura 5A). Nos tratamentos não inoculados houve um decréscimo desses valores nas doses 5 e 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado e o melhor desempenho foi na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado, comportamento que se repetiu nos tratamentos inoculados com BR 3267. Este resultado, provavelmente, foi influenciado pelo

maior teor de nitrogênio acumulado nas folhas dessas plantas (Figura 7B), o que estimulou a atividade da enzima Rubisco e consequente aumento da atividade fotossintética destas plantas (LONG et al., 2006).

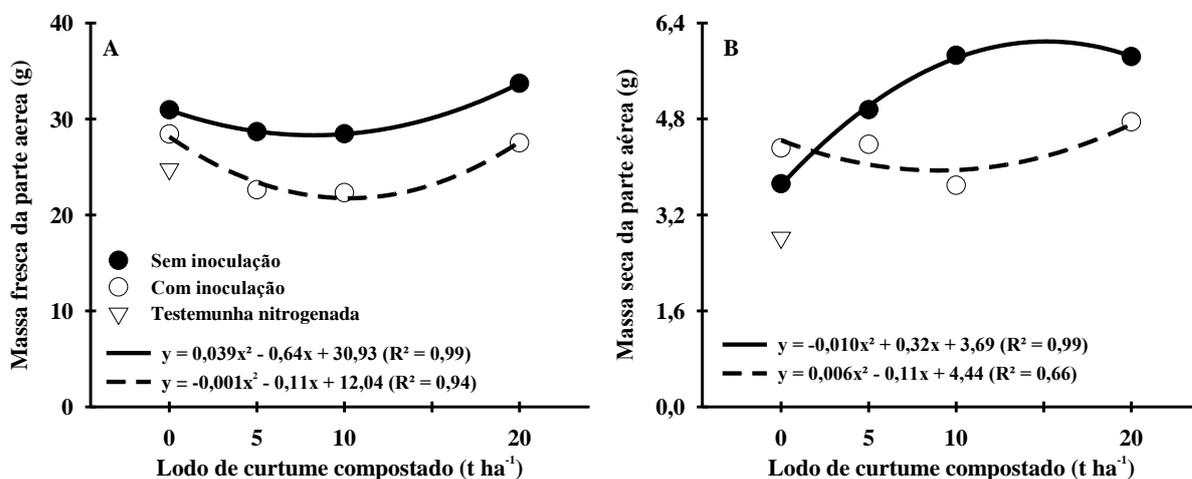


Figura 5. Parâmetros de (A) massa fresca ($CV^{\#}=16,10\%$) e (B) massa seca da parte aérea ($CV^{\#}=15,58\%$) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos às doses 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC).
#Coeficiente de variação.

A massa seca da parte aérea informa sobre o estado nutricional da planta, maiores valores podem inferir uma maior eficiência na translocação de fotoassimilados (BORGES et al., 2012). Na Figura 5B são apresentados os resultados referentes à massa seca da parte aérea onde foi possível constatar que não houve diferenças significativas entre os tratamentos aplicados para as plantas não inoculadas com BR 3267. Neste tratamento, o aumento da massa seca da parte aérea foi proporcional ao aumento das doses de lodo de curtume compostado. Para os tratamentos inoculados, o melhor desempenho foi na dose 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado, com comportamento variável entre as demais doses.

De acordo com Gualter et al. (2011), bactérias fixadoras de nitrogênio contribuem de forma significativa com um incremento da fixação biológica do nitrogênio e, logo, com o aumento de massa seca da planta. Em geral, as respostas do feijão-caupi à adubação nitrogenada e à inoculação têm sido variáveis quanto à produção de massa seca de parte aérea, sendo observados efeitos positivos ou, em alguns casos, efeitos não significativos (FARINELLI et al., 2006). A quantidade de nitrogênio fixado simbioticamente pela associação rizóbio-planta pode estar relacionada com a biomassa dos nódulos.

A massa seca dos nódulos é uma variável importante na avaliação da nodulação por rizóbios em virtude da melhor correlação com o desempenho simbiótico, o número e massa seca de nódulos são parâmetros indiretos que avaliam o processo de fixação biológica do nitrogênio (HUNGRIA; BOHRER, 2000; PEIXOTO et al., 2010). Neste estudo, houve diferenças significativas para massa fresca dos nódulos de plantas de feijão-caupi entre os tratamentos com e sem inoculação com BR 3267 nas diferentes doses de lodo de curtume compostado (Figura 6A).

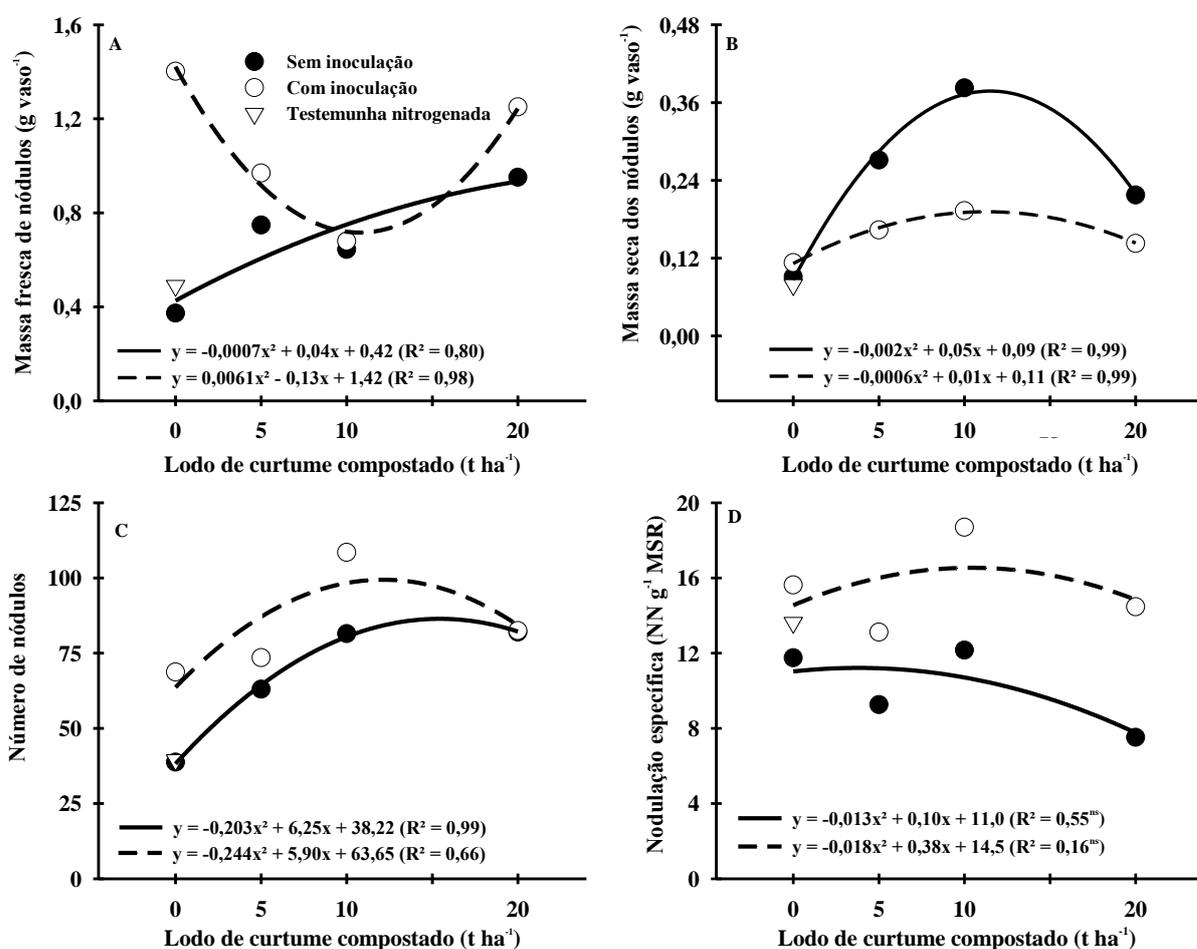


Figura 6. (A) Massa fresca (CV[#]=13,02%) e (B) seca (CV[#]=19,58%) de nódulos; (C) número de nódulos (CV[#]= 32,42%); e (D) nodulação específica (CV[#]= 12,56%) em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC). #Coeficiente de variação.

O comportamento evidenciado nos tratamentos que receberam a aplicação do lodo de curtume compostado associado à inoculação com BR 3276 mostrou que o aumento nas doses de lodo de curtume compostado não favoreceu o aumento na massa fresca dos nódulos,

havendo uma redução desse conteúdo nas doses 5 e 10 t ha⁻¹. Por outro lado, as plantas não inoculadas com BR 3267 e cultivadas na presença de lodo de curtume compostado apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com incremento da massa fresca dos nódulos nas doses 5 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 6A).

Quanto à massa seca dos nódulos, não foi possível detectar diferenças significativas entre os tratamentos inoculados ou não (Figura 6B). As testemunhas absoluta (TA) e nitrogenada (TN) apresentaram valores de MSN semelhantes (0,09 g vaso⁻¹). As plantas com aporte de lodo de curtume compostado (sem ou com inoculação) apresentaram valores de massa seca dos nódulos maiores, havendo um aumento desses valores até a dose de 10 t ha⁻¹. Os resultados mostraram que o *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) apresentou capacidade de nodular eficientemente as raízes de plantas de feijão-caupi. Entretanto, nas plantas cultivadas na dose 10 t ha⁻¹ houve maior número de nódulos e isto possivelmente resultou da atuação da população nativa de bactérias fixadoras existentes no solo.

Em relação ao número de nódulos (Figura 6C), o comportamento das plantas inoculadas com BR 3267 e cultivadas em solo com o lodo de curtume compostado foi variável, sendo registrado o maior incremento na dose 10 t ha⁻¹ (~108 nódulos vaso⁻¹) e menores valores na dose 5 t ha⁻¹ (~73,5 nódulos vaso⁻¹). Nos tratamentos sem inoculação com BR 3267, o número médio de nódulos em plantas de feijão-caupi foi maior na dose de 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (~81,5 e 82 nódulos vaso⁻¹, respectivamente) (Figura 6C). Estes resultados podem ser atribuídos ao fato da adição de elevados teores de nitrogênio (fornecido pelo lodo de curtume compostado) ao solo afeta a massa de nódulos, porém, parecem não inibir o desenvolvimento do nódulo e a FBN. De maneira geral, as aplicações de doses elevadas de nitrogênio, principalmente na semeadura, têm ação negativa sobre a nodulação e a FBN (CASSINI; FRANCO, 2006), comportamento observado na maior dose de lodo de curtume compostado para todos os tratamentos.

O número de nódulos por planta permite fazer inferências relativas à maior ou menor susceptibilidade do hospedeiro à infecção por bactérias do gênero *Rhizobium*. Assim, o número de nódulos é consequência da densidade de bactérias presentes no solo, representando uma medida quantitativa do número de células presentes, uma maior nodulação pode ser considerada como um forte indicativo de que a estirpe seja uma boa competidora e consegue se sobressair em relação a outros microrganismos do solo (ALMEIDA et al., 2010). Podemos observar ainda que o número de nódulos em plantas de feijão-caupi que não foram inoculadas

com BR 3267 e sem aporte de lodo de curtume compostado apresentaram valores semelhantes aos encontrados para a testemunha nitrogenada (38,8 e 39,5, respectivamente).

Não houve diferenças significativas para nodulação específica em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo sob aplicação de diferentes níveis de lodo de curtume compostado com e sem inoculação com BR 3267 (Figura 6D). Vale ressaltar que as plantas que foram inoculadas com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. apresentaram valores de nodulação específica superiores aquelas que não foram inicialmente inoculadas, mas que foram noduladas pelos rizóbios nativos do solo. De acordo com Freitas et al. (2012), as estirpes de rizóbio nativas do solo são muito competitivas, entretanto apresentam baixa eficiência na fixação de nitrogênio. As plantas de feijão-caupi que foram cultivadas em solo que recebeu aplicação de 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado encontrou-se a maior nodulação específica, mostrando um bom desempenho da simbiose entre feijão-caupi e *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267).

A quantidade de nitrogênio fixado simbioticamente pela associação rizóbio-planta pode estar relacionada com a biomassa dos nódulos, sendo muitas vezes expresso em termos de eficiência de fixação de nitrogênio que indica o conteúdo de nitrogênio acumulado na massa seca dos nódulos (DEY et al., 2004). No presente trabalho, as plantas inoculadas com BR 3267 apresentaram maior eficiência de fixação de nitrogênio quando comparadas as plantas do tratamento TN e as plantas não inoculadas nas diferentes doses de lodo de curtume compostado aplicadas ao solo (Figura 7A). Tal incremento foi progressivo de acordo com o aumento das doses de lodo de curtume compostado aplicadas e este resultado evidencia o efeito benéfico da presença do rizóbio na rizosfera.

Quanto ao teor de nitrogênio na massa seca da parte aérea, foi possível detectar diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7B). Neste experimento, as plantas que receberam inoculação com BR 3267 apresentaram acréscimo nessa variável com o aumento das doses de lodo de curtume compostado, registrando um efeito positivo da interação BR 3267 e das doses de lodo de curtume compostado aplicadas no solo. Tais resultados sugerem maior eficiência do rizóbio inoculado sobre os rizóbios nativos do solo, já que os valores encontrados foram superiores aos da testemunha absoluta (TA) e nitrogenada (TN). Na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado houve maior acúmulo de nitrogênio nos nódulos, mesmo sendo este o tratamento com maior concentração de metais pesados no lodo de curtume compostado.

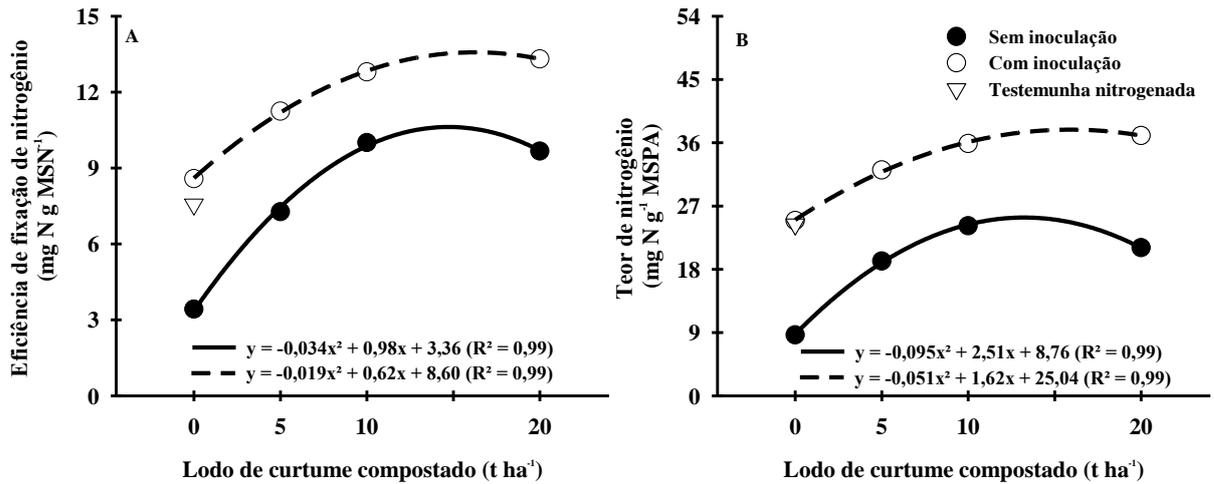


Figura 7. Parâmetros de (A) eficiência de fixação de nitrogênio e (B) teor de nitrogênio em plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC).

Foram registradas diferenças significativas para as variáveis nitrogênio acumulado na parte aérea e nos nódulos (Figura 8A). Houve maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com BR 3267, principalmente nas que foram cultivadas em solo com 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado. As plantas que não receberam inoculação apresentaram pico de acúmulo de nitrogênio quando cultivadas em solo com 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado.

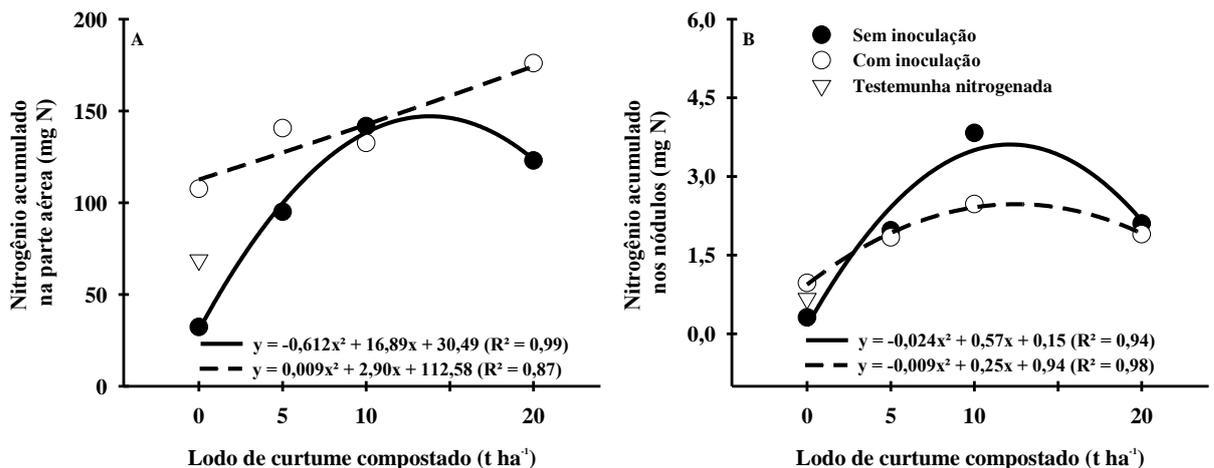


Figura 8. Nitrogênio acumulado na parte aérea (A) e em nódulos (B) de plantas de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidas às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (LCC).

Com relação ao nitrogênio acumulado nos nódulos, o maior acumulado foi observado em nódulos de plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com aplicação de 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 8B). As plantas de feijão-caupi não inoculadas mostram valores maiores (3,83 mg N) quando comparadas com aquelas que receberam a inoculação com BR 3267 (2,47 mg N).

A eficiência relativa e a eficácia, ambos mostrados na Tabela 2, foram calculadas a partir da comparação entre as plantas que receberam inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e as testemunhas absoluta (TA) e nitrogenada (TN), respectivamente. As plantas inoculadas com a BR 3267 apresentaram valores de eficiência relativa acima de 85%, sendo consideradas “muito eficientes” (DATE; NORRIS, 1979).

Tabela 2. Eficiência relativa e eficácia de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos às doses de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado.

| Doses de LCC (t ha ⁻¹) | Eficiência relativa (%) ¹ | Eficácia (%) ² |
|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 0 | 100,0 | 153,6 |
| 5 | 97,7 | 157,1 |
| 10 | 86,0 | 132,1 |
| 20 | 111,6 | 171,4 |

¹Eficiência = (matéria seca da parte aérea (MSPA) dos tratamentos inoculados/MSPA da testemunha absoluta) x 100;

²Eficácia = (matéria seca da parte aérea (MSPA) dos tratamentos inoculados/MSPA da testemunha nitrogenada) x 100.

As plantas de feijão-caupi inoculadas e submetidas a 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado apresentaram maior percentual de eficiência relativa (111,62%) e eficácia (171,42%) conforme mostrado na tabela 2. Estes resultados indicam que estas plantas, nas condições do experimento, apresentam melhor capacidade de fixar o nitrogênio e posteriormente fornecê-lo para que a planta possa crescer e se desenvolver adequadamente (FIGUEIREDO et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

As plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 e suplementadas com as diferentes doses de LCC não tiveram o crescimento prejudicado e demonstraram características de uma eficiente nodulação (manutenção dos níveis de nitrogênio e da FBN).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia

inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010.

BASTOS, E. A.; ANDRADE JUNIOR, A. S. Boletim Agrometeorológico do ano 2008 para o município de Teresina, PI. EMBRAPA Meio Norte (**Documentos**, 181), Teresina, 2008, 37p.

BENICASA, M. M. P. **Análise de Crescimento de Plantas** (noções básicas). Jaboticabal. FUNEP, 2004. 42p.

BORGES, P. R. S.; SABOYA, R. C. C.; SABOYA, L. M. F.; SANTOS, E. R.; SOUZA, S. E. A. Distribuição de massa seca e rendimento de feijão-caupi inoculadas com rizóbio em Gurupi (TO). **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2012.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA C., PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2 ed. Atual. Viçosa-MG: UFV, 2006. p. 143-170.

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 Agrônômica**, v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

DATE, R. A.; NORRIS, D. O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, n. 1, p. 85-104, 1979.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, p. 371-394, 2004.

FARIA S. M.; FRANCO, A. A. Obtenção de inoculantes eficientes para Fixação Biológica de Nitrogênio em espécies leguminosas arbóreas. Seropédica/RJ. **Documentos** 158, 2002.

FARINELLI, R.; LEMOS L. B.; PENARIO, F. G.; EGÉA, M. M.; GASPARATO, M. G. Adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro, em plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 307-312, 2006.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P. O.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. (Ed.) **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA Agrobiologia. Parte 4, Cap. 1, p. 387-414, 2010.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 109-114, 2012.

GUALTER, M. R. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GULDEN, R. H.; VESSEY J. K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g⁻¹ root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant Soil**, v. 198, p. 127-136, 1998.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347p.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 37p.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003.

LONG, S. P.; ZHU, X. Z.; NAIDU, S. L.; ORT, D. Can improvement in photosynthesis increase crop yields. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 3, p. 315- 330, 2006.

MOURA, J. B.; GUARESCHI, R. F.; CORREIA, A. R.; GAZOLLA, P. R.; CABRAL, J. S. R. Produtividade do feijoeiro submetido à adubação nitrogenada e inoculação com *Rhizobium tropici*. **Global Science and Technology**, v. 2, n.3, p. 66-71, 2009.

NASCIMENTO, C. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P.; FREIRE, M.; SOUSA, C. A. Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 2, n. 2, p. 579-587, 2008.

OLIVEIRA, M. L. J.; ARAÚJO, A. S. **Teores de Cr em plantas de feijão-caupi após 4 anos de aplicações consecutivas de composto de lodo de curtume**. III Congresso Nacional de feijão-caupi. Recife/PE, 2013, 5 p.

PEIXOTO, C. P. **Curso de Fisiologia vegetal**. Cruz das Almas, BA. 2010. P 177.

PEIXOTO, M. P.; PEIXOTO, C. ; SAMPAIO, L.; SAMPAIO, H.; SOUZA, R.; ALMEIDA, J. R. C. Ação do herbicida alachlor na microbiota do solo, nodulação e rendimento de plantas de amendoim. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 2, p. 60-70, 2010.

SILVA, A. R.; SOUSA, S. A.; SOUZA, D. J. A. T.; LEMOS, A. S.; COLLIER, L.; SILVEIRA, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CAVALCANTI, F. R.; FERREIRA-SILVA, S. L. Legume Nodule Oxidative Stress and N₂ Fixation Efficiency. In: **Microbial Ecology of Tropical Soils**. New York: Nova Science Publishers Inc. 2011. v. 1, p. 9-78.

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO J. L.; RODRIGUES, J. L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 19-23, 1998.

SOARES, B. L.; FERREIRA, P.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 171-180, 2014.

THORNTHWAITE, C. W.; MATHER, J. R. The water balance. In: **Climatology**. New Jersey: Drexel Institute of Technology, 1955, 104 p.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 749-758, 2009.

CAPITULO II

**Estresse oxidativo em nódulos de feijão-caupi cultivado em solo
com lodo de curtume compostado**

Resumo

O termo 'estresse oxidativo' descreve o desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa antioxidante. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) pode ser fortemente afetada pelo estresse oxidativo e, portanto, o sistema antioxidante tem a função de reduzir os danos causados pela ação deletéria dos compostos oxidantes e manter uma adequada FBN. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e cultivadas em solo com aplicação de diferentes doses de lodo de curtume compostado (LCC). O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados com esquema fatorial 4 x 2 x 2, sendo quatro doses de LCC (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹); inoculada ou não com BR 3267 e dois tempos de coleta (ponto de florescimento e de emissão de vagens). Após as coletas, determinou-se nos nódulos de plantas de feijão-caupi: o nível de peróxido de hidrogênio; a concentração de leghemoglobina (LHb); a atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e peroxidase de fenóis (POX); e das enzimas do metabolismo do nitrogênio desidrogenase do glutamato aminante (GDHa) e sintetase de glutamina (GS). Os níveis de peróxido de hidrogênio foram menores na dose de 10 t ha⁻¹ de LCC nos nódulos de feijão-caupi coletados no período de florescimento e na coleta das vagens. Observou-se que a LHb nos nódulos foi incrementada nas plantas inoculadas e submetidas à 5 t ha⁻¹ de LCC (no florescimento) e à 20 t ha⁻¹ (na emissão de vagens). As enzimas CAT, GDHa, GS e POX foram diferentemente moduladas com relação às doses de LCC aplicadas, presença ou ausência do BR 3267 e épocas de coleta. Durante o florescimento, período onde a eficiência simbiótica é maior, a atividade das enzimas antioxidantes foi maior nas doses 5 e 10 t ha⁻¹ de LCC nas plantas inoculadas com BR 3267. Já na coleta das vagens, a atividade das enzimas CAT, GDHa e POX foram aumentadas nas plantas inoculadas com BR 3267. Estas respostas podem estar associadas a contribuição da inoculação à habilidade de certos genótipos em degradar substâncias tóxicas liberadas em condições de estresse.

Palavras-chave: Resíduos industriais, Espécies reativas de oxigênio, Danos celulares.

Abstract

The term 'oxidative stress' describes the imbalance between the generation of oxidants compounds and the action of the antioxidant defense system. The biological nitrogen fixation (BNF) can be strongly affected by oxidative stress and therefore the antioxidant system works to reduce the damage caused by the deleterious effects of oxidizing compounds and maintain adequate BNF. The objective of this study was to evaluate the oxidative stress in nodules of cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) and grown in soil with application of different levels of tannery sludge composted (TSC). The experimental design was randomized blocks with a factorial scheme 4 x 2 x 2, being four doses of TSC (0; 5; 10; and 20 t ha⁻¹); inoculated or not with BR 3267 and two collect times (flowering and emission pods periods). After the collects, it was determined in the nodules of cowpea plants: the level of hydrogen peroxide; the concentration of leghemoglobin (LHb); the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT) and peroxidase phenols (POX); and of the nitrogen metabolism enzymes dehydrogenase of glutamate aminante (GDHa) and glutamine synthetase (GS). Hydrogen peroxide levels were lower at a dose of 10 t ha⁻¹ TSC in cowpea nodules collected at flowering and at collect of pods. It was observed that the LHb in nodules was increased in the inoculated plants and subjected to 5 t ha⁻¹ TSC (at flowering) and 20 t ha⁻¹ (at collect of pods). The CAT, GDHa, GS and POX enzymes were modulated differently with respect to TSC doses applied, presence or absence of BR 3267 and collect periods. During the flowering, period where the symbiotic efficiency is higher, the activity of antioxidant enzymes was higher at 5 and 10 t ha⁻¹ TSC levels in plants inoculated with BR 3267. Already at collect of pods, the activity of CAT, GDHa and POX enzymes were increased in plants inoculated with BR 3267. These responses may be associated with contribution of the inoculation to ability of certain genotypes in degrade toxic substances released during stressful conditions.

Keywords: industrial residues, reactive oxygen species, cellular damage.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são frequentemente submetidas as mais diversas situações de estresse e, portanto, recorrerem a diferentes formas de defesa em busca de eliminar os efeitos deletérios destes estresses e retomar seu metabolismo normal. Os produtos dessas reações são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) que se apresentam como radicais livres ou na forma molecular de um não radical (SOARES et al., 2007). Entretanto, a produção excessiva desses radicais resulta em danos oxidativos (SHAMI; MOREIRA, 2004). A exposição dos organismos a metais pesados pode proporcionar o aumento na concentração de radicais livres, também denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs mais comumente encontradas numa célula são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($\cdot O_2^-$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). O incremento destas EROs nas células vegetais pode ocasionar aumento na atividade de enzimas antioxidantes e de seus substratos específicos intracelulares que resultam em maior tolerância das plantas frente à presença das EROs (TARCHOUNE et al., 2010; CARVALHO et al., 2011).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é formado principalmente pelas enzimas dismutases do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase de fenóis (CARVALHO et al., 2011). Estas se encontram distribuídas, principalmente, nas mitocôndrias e nos cloroplastos que são locais com maior geração das EROs numa célula vegetal (APEL; HIRT, 2004). Estas enzimas antioxidativas previnem a ocorrência de danos celulares às plantas pois sequestram e degradam as EROs presentes na célula (SERKEDJIEVA, 2011). O aumento na atividade das enzimas antioxidativas nas células vegetais na presença de metais pesados tem sido sugerido como uma forma de defesa e, portanto, uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo (MISHRA et al., 2011). Além disso, uma situação de estresse oxidativo ocasiona a senescência dos nódulos e o consequente declínio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) devido ao aumento das reações oxidativas (RODRIGUES et al., 2013).

A capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes visa superar os efeitos do estresse oxidativo e minimizar os danos à FBN que, portanto, resultam em efeitos positivos no estabelecimento da cultura (MISHRA et al., 2011). Quando o processo de FBN é reduzido ou prejudicado há uma manifestação de danos celulares e, diante disso, é de vital importância o uso de práticas que favoreçam as contribuições proporcionadas pela FBN e reduzam os efeitos deletérios do estresse oxidativo e aumentem a produtividade vegetal (ALCANTARA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011). Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar o

metabolismo antioxidativo em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e cultivadas em solo com aplicações sucessivas de lodo de curtume compostado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrições da área de estudo, instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação localizada no campo experimental do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (Teresina/PI). O clima da região é classificado segundo Köppen como do tipo Tropical (Aw) e a média anual de precipitação é de 1.336 mm (BASTOS; ANDRADE JÚNIOR, 2008). Para a condução do experimento, foram utilizados vasos plásticos contendo 3,8 kg de um Neossolo flúvico de textura franco arenoso, coletado em uma área com aplicação de lodo de curtume compostado por seis anos consecutivos na profundidade de 0-20 cm.

2.2 Características do solo

O solo utilizado no experimento foi coletado em uma área submetida à aplicação de lodo de curtume compostado (LCC) por seis anos consecutivos com histórico de cultivo de feijão-caupi e milho (Tabela 1). A coleta foi realizada nas parcelas que recebiam o LCC em diferentes doses (5; 10; e 20 t ha⁻¹). Para as testemunhas, foi utilizado solo sem aplicação de LCC. O LCC aplicado ao solo foi obtido no curtume Europa localizado no município de Teresina/PI e compostado no Centro de Ciências Agrárias (CCA).

Tabela 1. Características químicas do solo com aplicação de lodo de curtume compostado (LCC) utilizado no experimento.

| Doses de LCC ¹ | Parâmetros analisados | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | pH (H ₂ O) | P (mg dm ⁻³) | K (mg dm ⁻³) | Na | Al (cmolc dm ⁻³) | Ca (cmolc dm ⁻³) | Mg (cmolc dm ⁻³) | Cr (t kg ⁻¹) |
| 0 | 6,2 | 3,31 | 42,3 | 1,0 | 0,07 | 0,77 | 0,10 | 4,73 |
| 5 | 7,0 | 7,95 | 51,0 | 1,1 | 0,07 | 1,51 | 0,16 | 61,18 |
| 10 | 7,3 | 11,20 | 49,5 | 1,2 | 0,06 | 1,32 | 0,19 | 65,23 |
| 20 | 8,1 | 18,60 | 58,5 | 1,2 | 0,06 | 1,61 | 0,48 | 253,49 |

¹Doses de LCC aplicadas em área experimental durante seis anos consecutivos. A dose zero corresponde ao controle e não apresenta aporte de LCC.

2.3 Preparo do inoculante, inoculação e condução do experimento

A estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. utilizada no experimento foi cedida pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) e esta foi inicialmente repicada para tubos de cultivo

contendo meio YMA (Agar, Manitol e Extrato de Levedura). Após verificada a purificação, procedeu-se a multiplicação da estirpe e o preparo do inoculante bacteriano. A bactéria foi repicada para frascos tipo Erlenmeyers contendo meio líquido YM (Manitol e Extrato de Levedura) e incubada em agitador rotatório (220 rpm; 28 °C; 96 h).

Após o preparo do inoculante, procedeu-se a inoculação das sementes de feijão-caupi e a implementação dos tratamentos (Figura 1). Para a inoculação, adicionou-se 1,0 mL de meio de cultura YM contendo a estirpe BR 3267 na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. As sementes de feijão-caupi cv. BRS Guariba inoculadas foram semeadas em vasos contendo as seguintes doses de lodo de curtume compostado (LCC): zero (controle); 5; 10; e 20 t ha⁻¹. Implementou-se ainda duas testemunhas: a testemunha absoluta, sementes de feijão-caupi não inoculada e não suplementada com adubação mineral; e a testemunha nitrogenada, sementes de feijão-caupi não inoculada e suplementadas com (NH₄)₂SO₄ aos 7, 14 e 21 dias após o desbaste conforme as recomendações da análise de solo.

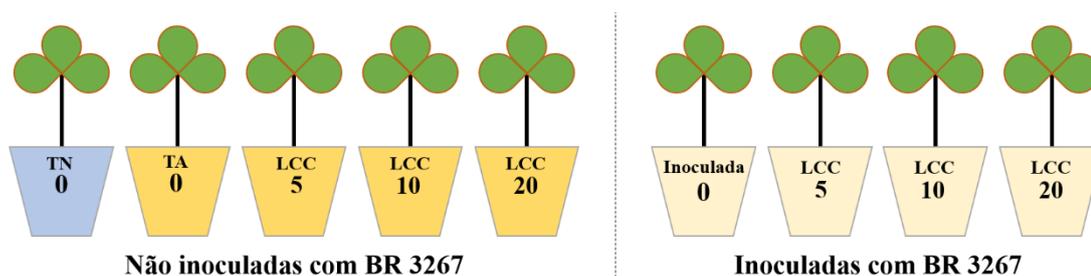


Figura 1. Esquema dos tratamentos após a inoculação das sementes com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. Os números 0, 5, 10 e 20 representam as doses de lodo de curtume compostado (LCC; t ha⁻¹). Os termos TN e TA representam as testemunhas nitrogenada e absoluta, respectivamente.

As sementes de feijão-caupi cv. BRS Guariba utilizadas no experimento foram cedidas pela Embrapa Meio Norte (Teresina/PI) e, antes da semeadura, seguindo metodologia proposta por Vincent (1970). O solo utilizado no experimento foi adubado antes do plantio conforme recomendação da análise do solo. Durante a condução do experimento, as plantas de feijão-caupi foram irrigadas duas vezes por semana com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Silveira et al. (1998) e isenta de nitrogênio. As regas com água foram feitas conforme a necessidade da cultura.

As coletas foram realizadas em duas épocas: no período de florescimento (aos 45 dias após emergência) e na emissão das vagens (aos 65 dias após emergência). No momento da

coleta, as plantas tiveram as suas raízes, nódulos e parte aérea (folhas) devidamente separadas. Após a separação das partições, os nódulos pesados e, imediatamente, congelados até o momento das determinações bioquímicas.

2.3 Determinações bioquímicas

2.3.1 Níveis de peróxido de hidrogênio e de leghemoglobina

Para determinar os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado o método descrito por Brennan e Frenkel (1977). Nódulos frescos (~100 mg) foram pesados e macerados na presença de 1,0 mL de TCA 5% por aproximadamente 3 min. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante recolhido. Posteriormente, 100 μ L do sobrenadante foi misturado com reagentes específicos e lido em espectrofotômetro a 415 nm. A concentração de H_2O_2 foi calculada com base em uma curva padrão de H_2O_2 e os dados foram expressos em μ mol H_2O_2 g^{-1} MF (massa fresca). Para a determinação da concentração de leghemoglobina, utilizou-se o reagente de Drabkin conforme descrito por Smaghe et al. (2009). A concentração de leghemoglobina foi calculada e expressa em mg g^{-1} MF.

2.3.2 Atividades enzimáticas

Para a determinação da atividade enzimática, macerou-se 0,1 g de nódulos frescos na presença de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) adicionado de EDTA 1,0 mM. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 25 min a 14.000 g (4 °C) e o sobrenadante foi recolhido e utilizado na determinação da atividade enzimática.

A determinação da atividade da enzima catalase (EC 1.11.1.6) foi realizada como descrito por Havir e Mchale (1987). Alíquotas de extrato enzimático foram adicionadas ao tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 20 mM a 30 °C. A atividade foi determinada com base no decaimento da absorvância a 240 nm e calculada com base no coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (36 mM^{-1} cm^{-1}) e expressa em μ mol H_2O_2 g^{-1} MF min^{-1} .

A atividade de desidrogenase do glutamato aminante (EC 1.4.1.2) foi determinada segundo metodologia proposta por Coombs e Hall (1982). Alíquotas do extrato foram misturadas ao meio de reação contendo tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 7,4) adicionado de α -cetoglutarato 7 mM, NH_4Cl 10 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM e NADH 0,25 mM. A reação foi

acompanhada em espectrofotômetro pelo decaimento da absorbância a 340 nm e os dados expressos em $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

A atividade da enzima sintetase de glutamina (EC 6.3.1.2) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Elliott (1955). Alíquotas do extrato enzimático foram transferidas para tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 0,25 M (pH 7,0), ATP 30 mM, glutamato de sódio 0,3 M, MgSO_4 0,5 M e solução de hidroxilamina [cloridrato de hidroxilamina e NaOH (1:1)]. Após 30 min em banho-maria (30 °C), a reação foi interrompida com adição da solução férrica ácida (FeCl_3 10% em HCl 0,2 M), TCA 24% e HCl 50%. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 10 min e a absorbância mensurada em 540 nm. A atividade da sintetase de glutamina foi calculada com base na curva-padrão de γ -glutamil-hidroximato (GGH) e os resultados expressos em $\mu\text{mol GGH g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$.

A atividade de peroxidase de fenóis (EC 1.11.1.7) foi determinada segundo Amako et al. (1994). Alíquotas do extrato enzimático foram transferidas para tubos de ensaio e misturados com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo pirogalol 20 mM. A reação foi conduzida a 25 °C e teve início com adição de H_2O_2 20 mM. Após 120 segundos, a reação foi interrompida com a adição ao meio de reação de H_2SO_4 0,5%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm e a atividade foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o pirogalol a 420 nm. Os dados expressos em $\mu\text{mol pirogalol g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

2.4 Análises estatísticas

O experimento foi executado em blocos inteiramente casualizado com esquema fatorial $4 \times 2 \times 2$, sendo quatro doses de LCC (0; 5; 10; e 20 t ha^{-1}); inoculada ou não com BR 3267 e dois tempos de coleta (ponto de florescimento e ponto de emissão de vagens), com três repetições. O efeito das doses de LCC foi avaliado com base na análise do coeficiente de determinação (R^2), enquanto que o efeito da presença ou ausência da inoculação, em cada diferente dose de LCC aplicada foi analisado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis foram submetidas previamente à análise de variância (ANOVA) utilizando o software ASSISTAT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi acumulado em maiores quantidades nos nódulos quando as plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 foram cultivadas em vasos

contendo 5,0 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado no período de florescimento (Figura 2A). No período de emissão das vagens, as plantas de feijão-caupi inoculados com BR 3267 e a testemunha absoluta (TA) e a nitrogenada (TN) apresentaram valores similares da concentração de H₂O₂ (Figura 2B). O acúmulo de H₂O₂ nessas doses pode influenciar negativamente a atividade fotossintética tendo em vista que pode reduzir a quantidade de moléculas envolvidas nesse processo, por exemplo, a degradação da Rubisco, conforme comentado por Soares et al. (2004). Além disso, as altas concentrações de H₂O₂ podem sinalizar condições de estresse no interior celular. O H₂O₂ é uma espécie reativa de oxigênio (EROs) de pequeno tamanho e, portanto, consegue atravessar membranas celulares e migrar em compartimentos diferentes, difundindo os danos e também atuando como um mensageiro da condição de estresse (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

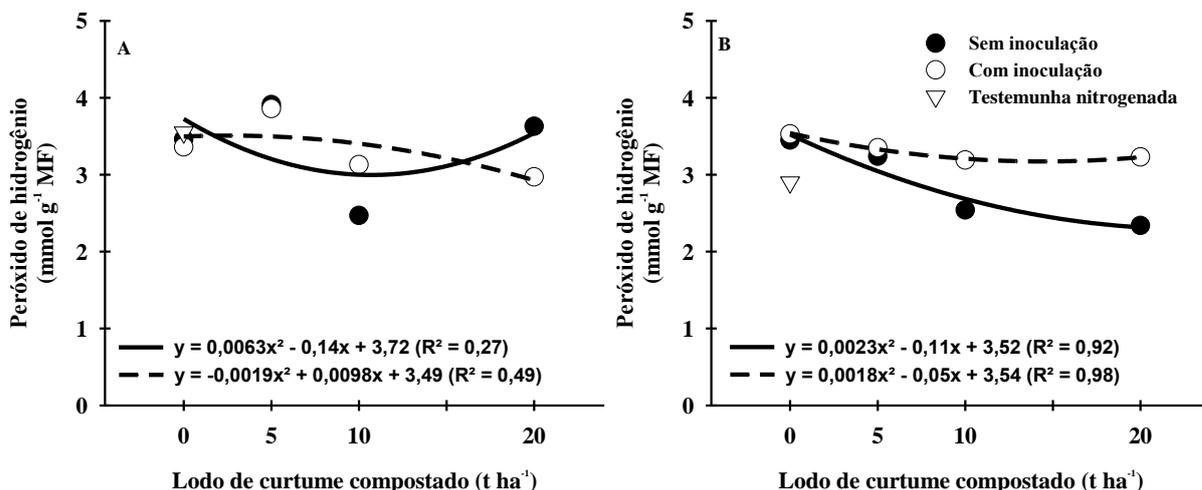


Figura 2. Níveis de peróxido de hidrogênio em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B).

A concentração de leghemoglobina foi incrementada em plantas inoculadas com BR 3267 e submetidas à dose de 5,0 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado, no período de florescimento e dose 20 t ha⁻¹ de LCC, no período de coleta de vagens (Figura 3). O processo de fixação biológica do nitrogênio está diretamente associado com o teor de leghemoglobina e esta variável pode ser utilizada como indicador de ocorrência deste processo. Conforme Appleby et al. (1992), a leghemoglobina atua na difusão de oxigênio (O₂) para os processos

de respiração e fosforilação oxidativa que ocorrem no bacteroide e mantêm a sua concentração em níveis baixos visando impedir a inativação da nitrogenase.

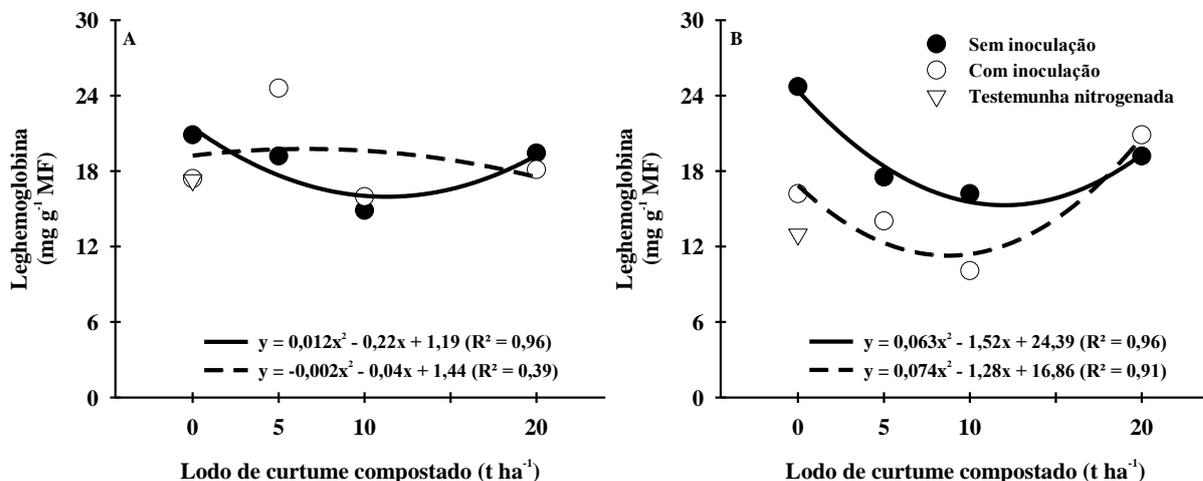


Figura 3. Concentração de leghemoglobina em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B).

Não houve interação significativa entre as doses de lodo de curtume compostado aplicadas e a atividade de catalase em nódulos de feijão-caupi nas duas épocas de cultivo (florescimento e na emissão das vagens) conforme mostrado na Figura 4. No período de florescimento, houve maior atividade de catalase em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 e submetidas à 5,0 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 4A). Já na época de emissão das vagens, observou-se maior atividade de catalase em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 e submetidas à 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 4B). A atividade da catalase é efetiva, sobretudo, em elevadas concentrações de H₂O₂ e, portanto, é considerada indispensável no controle de EROs, especialmente em condições de estresse severo (DUBEY, 2011).

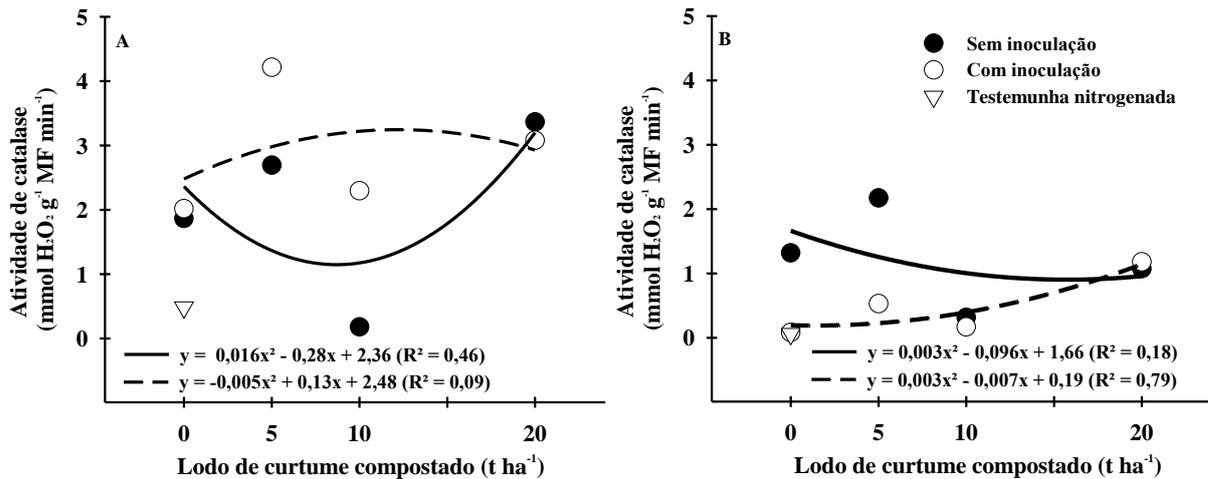


Figura 4. Atividade da enzima catalase em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B).

Observou-se maior atividade de glutamato desidrogenase aminante em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 no período do florescimento quando estas foram submetidas a 5,0 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 5A). No período de emissão das vagens, a atividade de glutamato desidrogenase aminante foi maior na dose 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 5B). A glutamato desidrogenase aminante atua no metabolismo do glutamato, molécula importante na assimilação de amônia, oxidação de proteínas de reserva e síntese de poliaminas que minimizam o estresse causado pela presença da EROs (LEA et al., 2007). Ferreira et al. (2002) ressaltam a importância da glutamato desidrogenase aminante na translocação de nitrogênio orgânico e em outros processos vitais que controlam o crescimento e o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, no acúmulo de fitomassa e na produtividade das culturas.

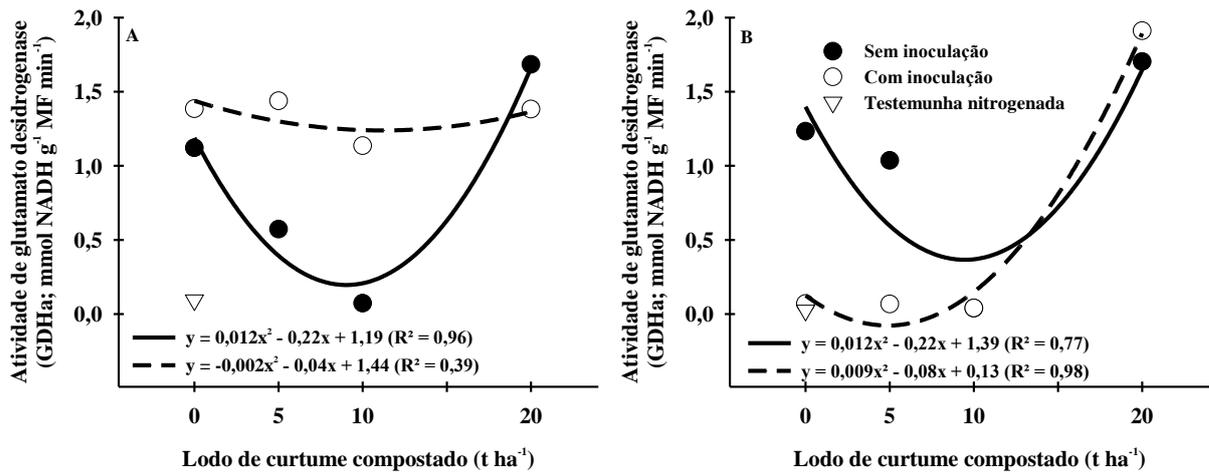


Figura 5. Atividade de glutamato desidrogenase aminante em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B).

A atividade da enzima sintetase de glutamina em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com BR 3267 no período do florescimento e na emissão das vagens está mostrada na Figura 6. A atividade de GS nos tratamentos inoculados com BR 3267 foi maior na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado tanto no período do florescimento (Figura 6A) quanto no período de coleta de vagens (Figura 6B). Segundo Larrainzar et al. (2009), a atividade de GS pode ser detectada já na fase inicial de estabelecimento dos nódulos e aumentam à medida que os nódulos se desenvolvem. A sintetase de glutamina atua na conversão da amônia em aminoácidos e previne seu acúmulo no interior dos bacteroides, o que poderia resultar em toxicidade e inibição da FBN e, portanto, é considerada uma via complementar em condições de alto suprimento de amônia ou de adversidade ambiental (WANG et al., 2007).

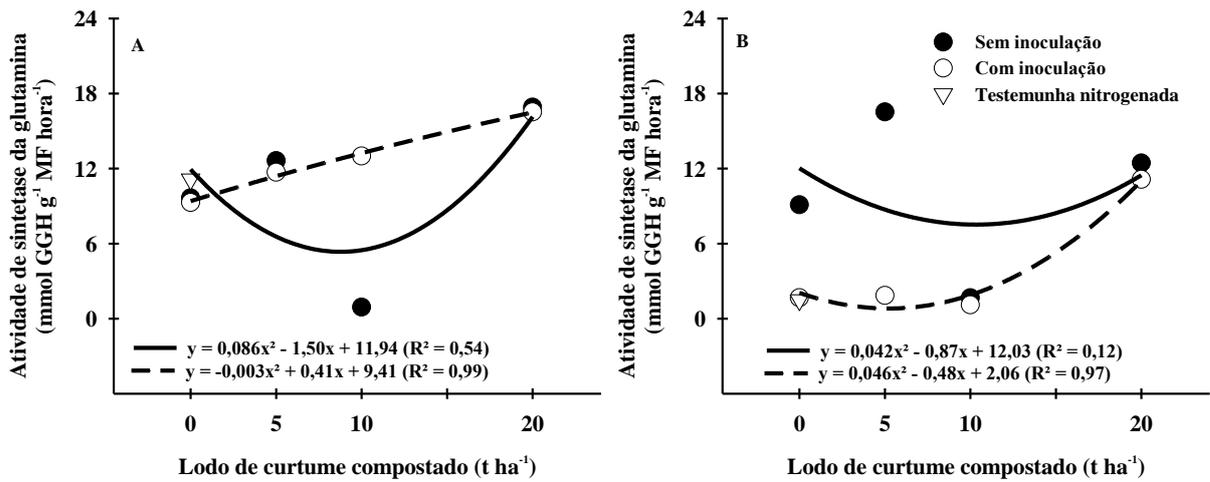


Figura 6. Atividade de sintetase de glutamina em nódulos de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) submetidas aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹) e coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B).

Não houve interação significativa entre as doses de lodo de curtume compostado aplicadas e a atividade de peroxidase em nódulos de feijão-caupi no florescimento e também na emissão das vagens (Figura 7). No florescimento, observou-se maior atividade de POX em nódulos de feijão-caupi inoculadas com BR 3267, principalmente na dose de 10 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 7A).

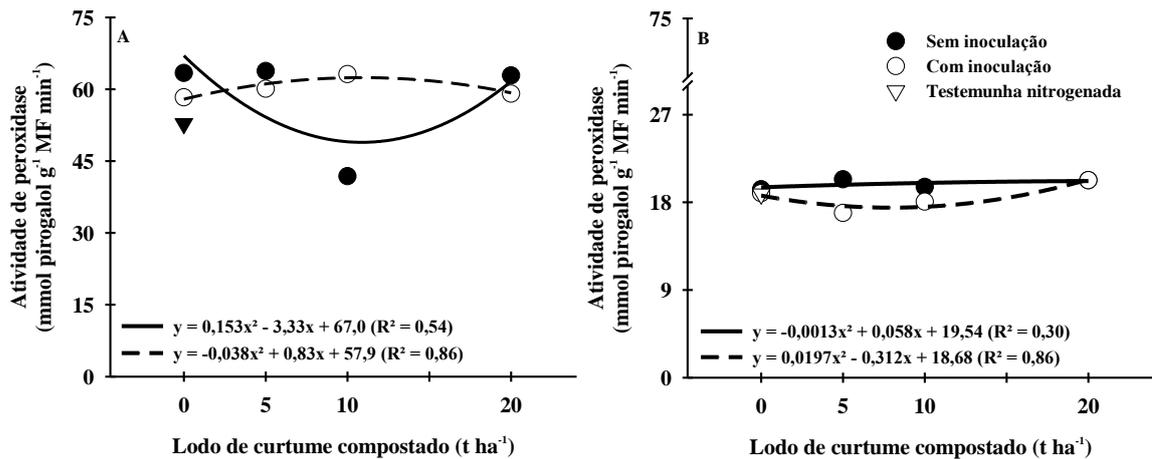


Figura 7. Atividade de peroxidase em nódulos de feijão-caupi sem e com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) coletados no período de florescimento (A) e na emissão das vagens (B) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado (0; 5; 10; e 20 t ha⁻¹ de LCC).

No período de emissão das vagens, a atividade de peroxidase foi mais elevada quando as plantas de feijão-caupi foram submetidas à 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (Figura 7B). A atividade elevada de peroxidase pode ser relacionada com inibição do crescimento vegetal e formação de pigmentos escuros nos nódulos (CARVALHO et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

A inoculação com a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. minimizou os efeitos do estresse oxidativo em nódulos de feijão-caupi cultivado em solo suplementado com lodo de curtume compostado. Estes efeitos positivos foram observados principalmente na dose de 20 t ha⁻¹ de lodo de curtume compostado (maior dose aplicada) e no período de emissão das vagens, época que corresponde ao aumento da senescência natural dos nódulos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, R. M. C. M.; ARAÚJO, A. P.; XAVIER, G. R.; ROCHA, M. M.; RUMJANEK, N. G. **Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos**. Embrapa Meio-Norte (Documentos 197), Teresina, 2009.
- APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- APPLEBY, C. A. The origin and functions of hemoglobin in plants. **Science Progress**, v. 76 p. 365-398, 1992.
- BASTOS, E. A.; ANDRADE JUNIOR, A. S. **Boletim Agrometeorológico do ano 2008 para o município de Teresina, PI**. Embrapa Meio-Norte (Documentos 181), 2008, 37 p.
- BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology**, v. 59, p. 411-416, 1977.
- CARVALHO, F. E. L.; LOBO, A. K. M.; BONIFACIO, A.; MARTINS, M. O.; NETO, M. C. L.; SILVEIRA, J. A. G. Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H₂O₂. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 4, p. 416-423, 2011.
- COOMBS, J., HALL, D. O. **Techniques in productivity and photosynthesis**. New York: Pergamon Press. 171p. 1982.
- DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap. 9, p. 178-203.
- ELLIOTT, W. Glutamine synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 337-342, 1955.
- FERREIRA, E. P. B.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. **Revista Caatinga**, v. 2, n. 4, p. 27-35, 2011.

- FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.
- HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347 p.
- KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.
- LARRAINZAR, E.; WIENKOOP, S.; SCHERLING, C.; KEMPA, S.; LADRERA, R.; ARRESE-IGOR, C.; WECKWERTH, W.; GONZÁLEZ, E. M. Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 1565-1576, 2009.
- LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A. J.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 150, p. 1-26, 2007.
- MISHRA, S., JHA, A. B., DUBEY, R. S. Arsenite treatment induces oxidative stress, up regulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 565-577, 2011.
- RODRIGUES, A. C.; BONIFACIO, A.; ANTUNES, J. E. L., SILVEIRA, J. A. G., FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 245-251, 2013.
- SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap. 13, p. 275-293.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.
- SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J. L.; RODRIGUES, J. L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 19-23, 1998.
- SMAGGHE, B. J.; HOY, J. A.; PERCIFIELD, R.; KUNDU, S.; HARGROVE, M. S.; SARATH, G.; HILBERT, J.; WATTS, R.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; BLOUIN, G. C.; OLSON, J. S.; APPLEBY, C. A. Review correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobin. **Biopolymers**, v. 91, n. 12, p. 1083-1096, 2009.
- SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica (Ciências Agrárias e Biológicas)**, v. 1, p. 9, 2007.
- SOARES, A. M. S.; SOUZA, T. F.; DOMINGUES, S. J. S.; JACINTO T.; MACHADO, O. L. T. Methyl jasmonate promotes the transient reduction of the levels of 2-Cysperoxiredoxin in *Ricinus communis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 543-547, 2004.

TARCHOUNE, I.; SGHERRI, C.; IZZO, R.; LACHAAL, M.; OUERGHI, Z.; NAVARIZZO, F. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 772-777, 2010.

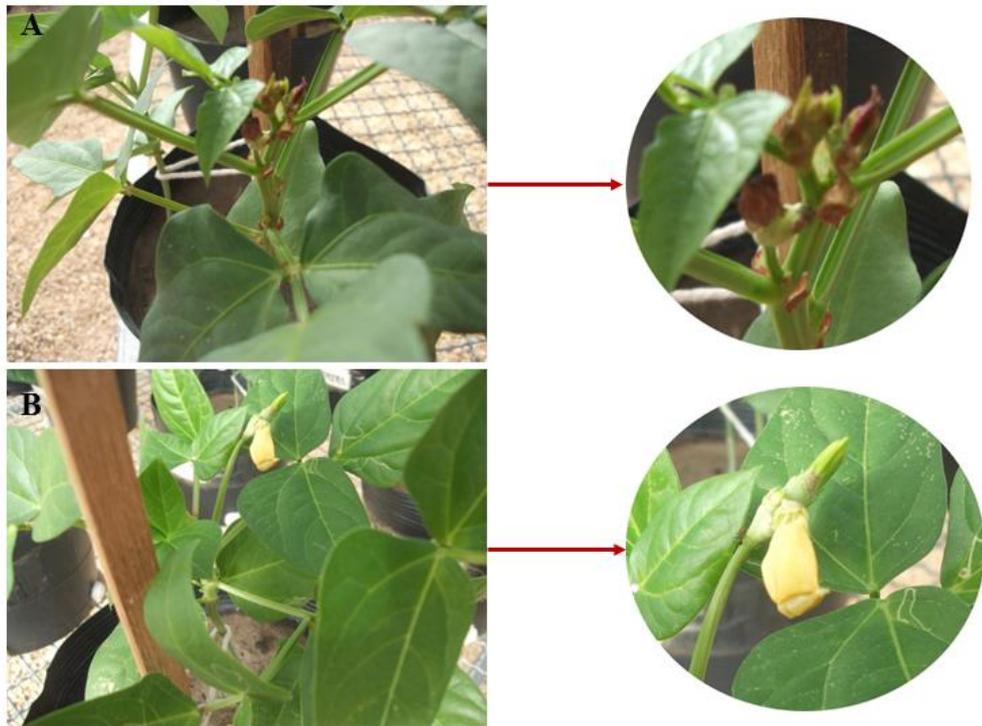
TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 397-403, 2005.

WANG, Q.; YUAN, Y. Z.; OU, J. Q.; LIN, Q. H.; ZHANG, C. F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 695-701, 2007.

ANEXOS



Anexo 1. Vista geral do experimento.



Anexo 2. (A) Emissão dos botões florais aos 40 dias após emergência; (B) início da floração aos 45 dias após emergência de plantas de feijão-caupi inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado.



Anexo 3. Plantas de feijão-caupi aos 45 dias após emergência inoculadas ou não com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e submetidos aos diferentes níveis de lodo de curtume compostado.