

BACTÉRIAS DIAZÓTRÓFICAS EM AGROSSISTEMAS INFLUENCIADOS PELA ADIÇÃO DE RESÍDUOS ANIMAIS NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA.

Julio Cesar Pires Santos¹, Kathleen Steiner², Priscila Stocco Theodoro³, Marília De Pieri⁴

¹ Orientador, Departamento de Solos e Recursos Naturais, CAV– julio.santos@udesc.br

² Acadêmica do Curso de Agronomia, CAV- bolsista PROBIC/UDESC.

³ Doutoranda do Departamento de Solos e Recursos Naturais, CAV

⁴ Acadêmica do Curso de Agronomia, CAV

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Fixação biológica de nitrogênio. Manejo do solo.

Estudo observacional sobre bactérias diazotróficas, realizado em sete manejos empregados ao solo, com diferentes tempos de aplicação de resíduos animais em áreas de milho para silagem com 22 anos de descarte de resíduos de animais, área de pastagem com 5 anos de descarte de resíduos de animais e mata nativa em Concórdia, Santa Catarina. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade com auxílio de um trado. Após as coletas as amostras foram acondicionadas, armazenadas a 4 °C e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo CAV/UDESC, onde foram mantidas sob refrigeração. O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado a partir de amostras de solo um experimento em câmara de crescimento da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão Tecnológica (EPAGRI) no município de Lages, com delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial, utilizando o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) como planta-armadilha sendo uma das leguminosas mais estudadas quanto à capacidade de estabelecimento de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. A cultivar utilizada foi IPR-88 Uirapuru, do grupo dos feijões pretos, de porte ereto, com hábito de crescimento arbustivo indeterminado. As sementes foram desinfestadas por submersão, respectivamente, em uma solução de álcool etílico (70%) por dois minutos e em uma solução de hipoclorito de sódio (1%) por três minutos. Em seguida, as sementes foram pré-germinadas em folhas de papel absorvente Gear Box[®], umedecidas com água destilada esterilizada, em câmara do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 25 °C, até a protrusão da radícula alcançar 2 cm de comprimento. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com controle de temperatura e foram colhidas 21 dias após a inoculação. Na sequência, as raízes com nodulação tiveram seus nódulos destacados, procedendo-se ao isolamento dos nódulos, de acordo com o número de morfotipos encontrados, todos da diluição 10⁻². Os nódulos escolhidos foram desinfestados com álcool etílico (70%) durante 30 segundos e em hipoclorito de sódio por cinco minutos e lavados por seis vezes em água destilada e esterilizada. Logo após, os nódulos foram macerados com auxílio de uma pinça esterilizada e riscados em placas de Petri contendo meio YM (VINCENT, 1970), com indicador vermelho congo e em pH 6,8 (FRED & WAKSMAN, 1928). Os isolados obtidos foram caracterizados conforme as características morfofisiológicas e formado uma coleção de trabalho

que foi mantida em geladeira na temperatura de 4 °C. Também foi realizada a identificação através da extração de DNA dos isolados com a utilização do kit ZR Fungal/Bacterial (Zymo Research Corp.), de acordo com as especificações do fabricante e posteriormente procedeu-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) da região que codifica o gene ribossomal universal bacteriano 16S, que possui um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases. Para a reação foram utilizados os primers universais 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). As amostras foram encaminhadas para o sequenciamento e estão aguardando a análise para o resultado das sequências. Para testar a coleção de isolados foram realizados três experimentos em câmara de crescimento da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão Tecnológica (EPAGRI) no município de Lages. O primeiro experimento avaliou a comunidade dos isolados nos três manejos de solos. O segundo experimento o objetivo foi avaliar as doses de nitrogênio, os isolados e os manejos de solo, no terceiro experimento foi observado a eficácia dos isolados. Os rizóbios usados nesse experimento foram da coleção de trabalho e as estirpes (*Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*), usadas como referência para a cultura do feijoeiro, foram obtidas da coleção mantida pela EMBRAPA Soja, Londrina, PR, Brasil. Utilizou-se para o experimento a cultivar Uirapuru (IPR-88). Para inoculação das plantas, o inóculo foi elaborado a partir de rizóbios crescidos em frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido YM, incubados por 3 dias a 28 °C, sob agitação a 100 rpm. Foram inoculadas alíquotas de 1 mL por vaso do caldo de cada rizóbio individualmente. Além dos tratamentos inoculados, foi conduzido um tratamento sem inoculação. Ao final do período de 30 dias, as plantas foram cortadas e a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa a 65 °C até apresentar peso constante. Foram avaliados a produção de massa seca da parte aérea e o acúmulo do teor de nitrogênio total na parte aérea. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico ASSISTAT e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Devido à complexidade dos experimentos serão apenas apresentados os dados referentes ao segundo experimento. Comparando os sistemas de manejo verificaram-se os maiores valores para os teores de nitrogênio e massa seca da parte aérea no sistema de manejo de pastagem, respectivamente, 63,74 mg e 3.330 mg. O sistema de manejo mata nativa não apresentou diferenças significativas para os teores de nitrogênio e massa seca da parte aérea quando comparado com os tratamentos com e sem inoculação. A mata nativa é considerada um sistema em equilíbrio em que a entrada e a saída de nutrientes é mínima, assim, devido ao alto custo energético para manter a simbiose e a disponibilidade de nitrogênio no sistema, ocorre a diminuição da nodulação e a consequente diminuição da população de bactérias diazotróficas. O sistema de manejo milho na variável massa seca da parte aérea apresentou destaque para os isolados 1, 4, 6 e 7, já para o teor de nitrogênio apenas o isolado 6 foi superior aos demais tratamentos. As plantas inoculadas com o isolado 4 e a estirpe *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* recomendada para a cultura do feijoeiro aumentaram os valores de massa seca da parte aérea no sistema de manejo pastagem.