



Nitrogênio fixado em plantas utilizadas como adubos verdes no Município de Juazeiro – BA⁽¹⁾.

Andrea Avelino da Silva⁽²⁾, Reginaldo Alves Ferreira Neto⁽³⁾; ⁽²⁾; Renata Janaína Carvalho de Souza⁽³⁾; Benaia Gonçalves de França Barros⁽⁴⁾; Ana Dolores Santiago de Freitas⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). ⁽²⁾ Doutoranda, programa de pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares - PROTEN; Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Recife, Pernambuco; netoaferreira@gmail.com; ⁽³⁾ Doutorando, programa de pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares - PROTEN; Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Recife, Pernambuco; ⁽⁴⁾ Mestranda, programa de pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares - PROTEN; Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Recife, Pernambuco; ⁽⁵⁾ Engenheira Agrônoma, Pesquisadora; Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Departamento de Agronomia; Recife, PE.

RESUMO: Adubos verdes podem substituir ou complementar a adubação mineral e representar uma fonte de matéria orgânica, garantindo maior sustentabilidade aos sistemas agrícolas. O objetivo desse trabalho foi estimar as quantidades de nitrogênio aportadas por coquetéis de plantas utilizadas como adubos verdes no município de Juazeiro – BA. Foram testados duas misturas de espécies denominadas de coquetéis e vegetação espontânea. A crotalaria (*Crotalaria spectabilis* Roth) e o feijão-macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp) fixaram entre 37 e 51 % do N contido em suas biomassas. O milho (*Zea mays* L.) e o sorgo (*Sorghum bicolor* L. R. Br.) apresentaram baixas concentrações de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$, indicando fixação biológica de N, especialmente o sorgo, com até 79 % de N derivado da fixação. Os tratamentos não influenciaram a produtividade do melão. As quantidades de N acumulados pelos coquetéis vegetais foram de aproximadamente 160 kg ha⁻¹ nas duas misturas de espécies.

Termos para indexação: abundância natural do ¹⁵N, fixação biológica de nitrogênio, semiárido.

INTRODUÇÃO

No semiárido brasileiro, áreas convertidas à agricultura perdem carbono e nutrientes com velocidade maior que as encontradas em outras regiões (Tiessen et al., 1992), o que pode levar à rápida perda da capacidade produtiva. A sustentabilidade da atividade agrícola nesta região requer a maximização da produtividade e a manutenção da capacidade dos solos de prover água e nutrientes para as plantas.

A adubação verde é uma alternativa na busca de melhorar a eficiência na produção agrícola associado à sustentabilidade já que consiste na utilização de material vegetal visando à recuperação

das características químicas, físicas e biológicas do solo (Nascimento et al., 2005). Leguminosas e gramíneas são as plantas mais utilizadas como plantas de cobertura ou adubos verdes. As leguminosas possuem um papel importante na agricultura por serem as principais espécies fixadoras de N (Ojien et al. 2014).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) ocorre através da associação dessas plantas com microrganismos diazotróficos capazes de transformar o N₂ atmosférico em NO³⁻ e NH⁴⁺ (Bottomley & Myrold, 2007). O uso de leguminosas como adubos verdes tem como benefício a substituição ou complementação da adubação mineral, assim como também proteção do solo e contra a erosão, além de evitar a propagação de ervas daninhas (Ambrosano et al., 2005).

As gramíneas, por sua vez, são os adubos verdes mais utilizados por assegurarem maiores aportes de C (Steenwerth & Belina, 2008), entretanto algumas espécies também tem apresentado potencial como adubo verde por fixar N em associação com bactérias diazotróficas endofíticas ou associativas (Coelho et al., 2009; Morais et al., 2012).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi estimar o nitrogênio aportado e o N fixado por misturas de plantas cultivadas como adubos verdes.

MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento foi conduzido a campo, na Estação Experimental Mandacaru da Embrapa Semiárido, localizada no município de Juazeiro, Bahia (09° 24' S; 40° 26' O; 375,5 m), em 2012. A precipitação média anual na região é de 542 mm, concentrada entre janeiro e abril. O solo está classificado como Vertissolo Háplico Órtico (Embrapa, 2006).

Tratamentos e amostragens

Os coquetéis foram preparados misturando



sementes de dois grupos de espécies: 1) as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* L. DC), feijão-macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp) e crotalária (*Crotalaria spectabilis* Roth); e 2) as gramíneas milho (*Zea mays* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L. R. Br.) e mais o girassol (*Helianthus annuus* L.). As sementes foram misturadas em duas proporções relativas às densidades de semeadura (sementes m⁻¹) recomendadas para cada espécie: 1) no coquetel 1, as sementes foram misturadas em quantidades correspondentes a 50% da recomendação para girassol e cada uma das gramíneas e 150% da recomendação de cada espécie de leguminosa; e 2) no coquetel 2, as sementes foram misturadas em quantidades correspondentes a 150% da recomendação para girassol e cada uma das gramíneas e 50% da recomendação de cada espécie de leguminosa.

Todas as espécies dos coquetéis foram semeadas em 12 linhas espaçadas de 50 cm, em parcelas de 6 m x 8 m, tomando-se medidas para garantir a uniformidade de distribuição das sementes.

Aos 70 dias após semeadura, quando a maioria das plantas dos coquetéis atingiu o estágio de pleno florescimento, um quadrado de 1 m² foi delimitado aleatoriamente em cada parcela, incluindo as parcelas não semeadas com coquetel e apenas com plantas espontâneas, e toda a biomassa aérea vegetal foi coletada. Nas parcelas correspondentes aos coquetéis, a biomassa de cada uma das espécies semeadas foi pesada separadamente. As plantas espontâneas não foram separadas por espécie, sendo determinado o peso total do material composto, que em sua maioria pertencia a gramíneas, mas incluía também algumas dicotiledôneas. Em todos os casos, subamostras das biomassas frescas foram coletadas e pesadas, para determinação dos teores de umidade e análises.

As amostras foram secas em estufa a 65 °C, pesadas, moídas e preparadas para determinação dos teores de N totais (%) (Embrapa, 1999) e análises isotópicas e ¹⁵N por espectrometria de massa.

A abundância natural foi expressa em unidades de “delta”, que é o desvio por mil (‰) da abundância de ¹⁵N da amostra em relação ao padrão, no caso o N₂ atmosférico:

$\delta = (\text{Ramostra/Rpadr\~{a}o} - 1) \times 1000$,
onde Ramostra e Rpadr\~{a}o são as razões ¹⁵N:¹⁴N da amostra e do padrão (N₂ atmosférico), respectivamente.

O percentual de nitrogênio derivado do ar (%N_{dda}), utilizando o método da abundância natural do ¹⁵N (Shearer & Kohl, 1986) foi calculado através da equação:

$$\%N_{dda} = [(\delta^{15}N_{\text{(refer\~{e}ncia)}} - \delta^{15}N_{\text{(fixadora)}}) / \delta^{15}N_{\text{(refer\~{e}ncia)}} - B] \times 100$$

Onde: $\delta^{15}N_{\text{(refer\~{e}ncia)}}$ é o valor médio dos $\delta^{15}N$ das plantas referência (girassol), $\delta^{15}N_{\text{(fixadora)}}$ é o valor dos $\delta^{15}N$ de cada espécie alvo (leguminosas e gramíneas) em cada parcela e B é o valor de $\delta^{15}N$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Para as leguminosas, os valores de B foram: -1,61‰, para o feijão-macassar e -1,08‰, para a crotalária (Unkovich et al., 2008) e -1,00‰ para o feijão-de-porco (Ojiem et al., 2007). Para as gramíneas foi utilizado o valor de B = 0‰ (Morais et al., 2012). Também foi realizada uma simulação utilizando o valor de B = -1‰ para todas as espécies.

A quantidade de N fixado na parte aérea das plantas foi estimada multiplicando o valor de %N_{dda} pelo conteúdo de N de cada planta fixadora, obtido através do produto da concentração de N e da biomassa seca da parte aérea.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a diferentes análises de variância, de acordo com a variável dependente e com a montagem do experimento. Os dados dos sinais de $\delta^{15}N$ (‰) foram analisados separadamente para cada coquetel, considerando um experimento em blocos ao acaso com seis repetições. Os valores de cada espécie potencialmente fixadora foram comparados com os valores do girassol. Os dados das concentrações e das quantidades de N nas plantas e da %N_{dda} e das quantidades de N fixadas nas diferentes espécies dos coquetéis foram submetidas à análise de variância considerando o delineamento em blocos ao acaso com três repetições e parcelas subdivididas. Os dados de proporções foram transformados em arco seno e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores concentrações de N foram encontrados nas leguminosas (Tabela 1), com destaque para o feijão-de-porco, com mais de 3%. As concentrações no girassol e nas gramíneas foram sempre menores que 2%, semelhantes às das plantas espontâneas (Tabela 2).

Os valores de $\delta^{15}N$ médios do feijão-caupi, da crotalária, do milho e do sorgo foram significativamente menores que o valor médio do girassol, com diferença chegando a -3.61‰ no caso



do sorgo (Tabela 2). Este resultado foi considerado como uma forte indicação de absorção de N atmosférico e uma situação propícia para estimativas confiáveis do percentual de N fixado (Högberg, 1997). Apesar de cultivado juntamente com as demais espécies dos coquetéis, o girassol apresentou sinal isotópico bastante próximo do sinal das plantas da vegetação espontânea, indicando que não ocorreu transferência de N fixado entre as plantas cultivadas juntas em cada coquetel.

Em gramíneas, baixos sinais de $\delta^{15}\text{N}$ evidenciando fixação biológica de N (FBN) foram relatadas recentemente para cana-de-açúcar (Urquiaga et al., 2012), milho (Montañez et al., 2009) e capim elefante (Morais et al., 2012), entre outras, mas não para o sorgo. Geralmente, o sorgo apresenta sinais isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ maiores que os de leguminosas cultivadas em consórcio, demonstrando dependência exclusiva do N do solo e, por isso, até é utilizado como planta referência para estimativa da FBN nas leguminosas (Ncube et al 2007; Resende et al. 2003). Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho indicam que o sorgo pode ser capaz de obter N de uma fonte empobrecida de ^{15}N , possivelmente a atmosfera.

Alguns trabalhos relatam que bactérias fixadoras de N_2 podem associar-se ao sorgo, principalmente dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* (James et al. 1997; Bergamaschi et al. 2007; Luna et al. 2010; Coelho et al. 2009, entre outros). Porém como não há relatos de evidência isotópica de FBN para o sorgo, ainda não está esclarecido se esses micro-organismos estimulam o crescimento da planta pelo aumento da disponibilidade de N via FBN ou se é pela produção de substâncias promotoras de crescimento que, comprovadamente, provocam alterações morfológicas na raiz (como o aumento das raízes laterais e dos pelos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes (Steenhoudt & Vandereyden 2000).

As quantidades totais de N fixadas por todas as espécies não diferiram entre os coquetéis (Tabela 1), havendo pouca diferença nas estimativas utilizando o valor de $B = -1\text{‰}$ para todas as espécies ou os valores de B relatados na literatura para o feijão-macassar e a crotalária (Unkovich et al., 2008), o feijão-de-porco (Ojiem et al., 2007) e as gramíneas (Morais et al.2012). São quantidades expressivas de N, que podem significar menor dependência da aplicação de fertilizantes nitrogenados.

CONCLUSÕES

As leguminosas contribuíram com grande aporte N nos coquetéis vegetais.

Além da fixação nas leguminosas, os sinais isotópicos no milho e, principalmente, no sorgo indicam fixação biológica de N_2 atmosférico.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Empresa Brasileira de (EMBRAPA) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E. A.; GUIRADO, N.; ROSSI, F; MENDES, P. C. D; MURAOKA, T. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. *Scientia Agricola*, 62:534-542, 2005.

BERGAMASCHI, C; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, 37, 3:727- 733, 2007.

BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D. D. Biological N inputs. In: PAUL, E. A. (Org.). *Soil Microbiology, ecology and biochemistry*. Oxford: Academic Press, p.365-388, 2007.

COELHO, M. R. R.; MARRIEL, I. E.; JENKINS, S. N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A.G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 42:48-53, 2009.

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Fábio César da Silva (Org.), Brasília, 1999, 370p.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ed. Rio de Janeiro, 2006, 306p.

HÖGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, 137:179-203, 1997.

JAMES, E.K., OLIVARES F.L., BALDANI J.I. , DOBEREINER J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L Moench. *Journal of Experimental Botany*, 48:785-797, 1997.

LUNA, M.F.; GALAR, M.L.; APREA, J.; MOLINARI, M.L.; BOIARDI, J.L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnology Letters*, 32:1071-1076, 2010.



MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils*, 45:253-263, 2009.

MORAIS, R. F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Plant and Soil*, 349:1-12, 2012.

NASCIMENTO, J. T.; SILVA, I. F.; SANTIAGO, R. D.; SILVA NETO, L. F. Efeito de leguminosas nos atributos físicos e carbono orgânico de um Luvissole. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:825-831, 2005.

NCUBE, B., TWOMLOW, S.J., VAN WIJK, M.T., DIMES, J.P., GILLER, K.E. Productivity and residual benefits of grain legumes to sorghum under semi-arid conditions in southwestern Zimbabwe. *Plant and Soil*, 299:1-15, 2007.

OJIEM, J.O.; VANLAUWE, B.; RIDDER, N.; GILLER, K.E. Niche-based assessment of contributions of legumes to the nitrogen economy of Western Kenya smallholder farms. *Plant and Soil*, 292:119-135, 2007.

OJIEM J.O.; FRANKE A.C.; VANLAUWE B.; DE RIDDER N.; GILLER K.E. Benefits of legume–maize rotations: Assessing the impact of diversity on the productivity of smallholders in Western Kenya. *Field Crops Research*, 168:75-85, 2014.

RESENDE, A.S.; XAVIER, R.P.; QUESADA, D.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Use of green manures in increasing inputs of biologically fixed nitrogen to sugar cane. *Biology and Fertility of Soils*, 37:215-220, 2003.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13:699-756, 1986.

STEENHOUDT, O.; VANDEREYDEN, J. *Azospirillum*, free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:487-506, 2000.

STEENWERTH, K.; BELINA, K. M. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. *Applied Soil Ecology*, 40:359-369, 2008.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Canberra: ACIAR, 2008. 258p.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA, J. S.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of

biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, 356:5-21, 2012.

TIESSEN, H.; SALCEDO, I.H.; SAMPAIO, E.V.S.B. Nutrient and soil organic matter dynamics under shifting cultivation in semi-arid Northeastern Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38:139-151, 1992.

TABELAS

Tabela 1 - Concentração e estoque de N na parte aérea de espécies leguminosas e não leguminosas de utilizada como adubos verdes (duas misturas de espécies, denominadas de coquetéis).

Adubos verdes	Concentração de N (%)	N acumulado (kg ha ⁻¹)	N fixado (kg ha ⁻¹)	
			I	II
Coquetel 1				
Leguminosas	2.82 aA	98.0 aA	43.5 aA	44.4 aA
Não leguminosas	1.48 bA	62.5 aA	25.6 aA	21.1 aA
Total	2.06 A	160.5 A	69.1 A	65.5 A
Coquetel 2				
Leguminosas	2.63 aA	66.4 aA	26.7 aA	27.6 aA
Não leguminosas	1.53 bA	93.5 aA	24.0 aA	19.3 aA
Total	1.80 B	159.9 A	50.8 A	46.9 A
Plantas espontâneas	1.74	58.05	-	-

Letras maiúsculas comparam os valores entre os coquetéis e minúsculas comparam os valores de leguminosas e não leguminosas dentro de cada coquetel

Tabela 2 - Abundância natural de ¹⁵N e concentração de N (%) em espécies de dois coquetéis vegetais cultivados como adubos verdes.

Espécie	δ ¹⁵ N (‰)	%N
Feijão-macassar	1.73 b	2.95 a
Crotalária	2.47 b	2.52 a
Feijão-de-porco	2.73 ab	3.20 a
Girassol	4.56 a	1.67 b
Milheto	3.10 ab	1.54 b
Milho	2.08 b	1.47 b
Sorgo	0.95 b	1.20 b
Plantas espontâneas	4.88	1.74

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.