

# Isolamento e Seleção de estirpes de Rizóbios para espécies de adubo verde<sup>1</sup>

Giovanna Moura Calazans<sup>2</sup>, José Carlos Cruz<sup>3</sup>, José Aloísio Alves Moreira<sup>3</sup> e Ivanildo Evódio Marriel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Engenharia Ambiental do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

## Introdução

A necessidade de preservação e conservação do meio ambiente estimula cada vez mais pesquisas em sistemas orgânicos de produção. Esses sistemas se baseiam na produção de alimento sem o uso de fertilizantes, pesticidas e produtos reguladores de crescimento. Seus seguidores defendem o melhoramento da qualidade do solo e a produção de alimentos mais saudáveis. Essas práticas consistem no uso de esterco animal, rotação de culturas, adubação verde, compostagem, controle biológico de pragas e doenças como cita a Associação de Agricultura Orgânica (2010), entre outros.

Desse modo, a utilização de leguminosas é cada vez mais viável e frequente em sistemas orgânicos. Além de se adaptarem a diferentes condições edafoclimáticas, seu uso como adubo verde promove melhoria nas qualidades físicas, químicas e biológicas do solo e o protege contra a erosão. Uma das grandes vantagens dessas espécies é a capacidade de se relacionarem simbioticamente com bactérias da família Rhizobiaceae, que convertem o nitrogênio gasoso a amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (formas utilizáveis pela planta), por meio de redução catalisada por enzimas (MARTINS et al., 2003) e, em troca, a planta hospedeira fornece proteção e nutrientes (cerca de 30% do C fixado pela fotossíntese é exsudado pela raiz), de acordo com Rumjanek (2009). De acordo com Vieira et al. (2001), a fixação simbiótica pode suprir de 40% a 85% as necessidades da planta em nitrogênio, o que é um fato considerável, já que o nitrogênio é um dos nutrientes que mais limita a produtividade das culturas.

Ao selecionar estirpes de Rizóbios, deve-se verificar a capacidade de nodulação da espécie, coletar os nódulos, isolar as bactérias, purificar as colônias e selecionar as estirpes mais eficientes em vasos com substrato esterilizado e com solo não esterilizado, como é orientado por Faria e Franco (2002). Para diversas espécies de leguminosas arbóreas úteis como adubo verde e/ou para recuperação de áreas degradadas, principalmente nativas do Cerrado e Caatinga, ainda não se conhece estirpes eficientes para uso como inoculante. Os objetivos deste trabalho foram isolar e selecionar estirpes eficientes de rizóbio para leguminosas arbóreas utilizadas como adubos verdes, incluindo uma espécie de leguminosa arbórea nativa do Cerrado e Caatinga.

## Material e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

### Bioensaio 1. Avaliação da pureza de rizóbio em inoculantes.

Amostras de inoculantes conservados em geladeira, provenientes da Embrapa Agrobiologia, das espécies de leguminosas: *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria juncea*, feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), guandu (*Cajanus cajan*) e mucuna-preta



**Figura 01.** Colônia isolada com características típicas de rizóbio.

(*Mucuna aterrima*) foram avaliadas quanto à pureza em meio de cultura YMA sólido (HUNGRIA, 1994). Alíquotas de diluições seriadas decimais foram transferidas para placas contendo o meio de cultura de acordo com Hungria (1994). Colônias isoladas de bactérias com características típicas de rizóbio (colônias de aspecto brilhante e que não absorveram ou absorveram muito pouco o corante Vermelho Congo presente no meio) (Figura 01), foram transferidas para novo meio de culturas e preservada sob óleo mineral esterilizado. Para testar a eficiência de nodulação dessas estirpes, realizou-se vários ensaios.

### **Bioensaio 2: Teste de eficiência de nodulação de cada estirpe em vasos de areia lavada**

Para avaliar a eficiência de nodulação das estirpes obtidas, conduziu-se ensaio em casa de vegetação em vasos contendo 3kg de areia lavada com os seguintes tratamentos: (i) Controle – sem inoculação, (ii) 2 estirpes de cada um dos cinco inoculantes testados. Para a obtenção de cada inóculo, as células de cada estirpe foram cultivadas em meio líquido durante 48 horas, sob agitação, à temperatura de 29°C. Uma alíquota de 3mL de cada cultura enriquecida foi adicionada à semente no vaso. Essa operação foi repetida após uma semana. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva (HUNGRIA, 1994) meia força semanalmente. Após 60 dias de crescimento, as plantas foram coletadas para contagem de número de nódulos.

### **Bioensaio 3: Teste de eficiência de nodulação de cada estirpe em vasos de areia e terra na proporção 1:1**

Neste caso utilizou-se como substrato uma mistura de areia lavada e terra na proporção 1:1 para reavaliação do mesmo tratamento descrito no bioensaio 2.

### **Bioensaio 4: Reisolamento de bactérias a partir dos nódulos de plantas cultivadas em casa de vegetação**

Após 60 dias de crescimento das plantas nos ensaios de casa de vegetação efetuou-se o reisolamento, a partir dos nódulos, de cada uma das estirpes testadas em cada leguminosa. Para isolamento, os nódulos foram lavados e desinfestados com álcool durante 10 minutos. Cada nódulo, separadamente, foi triturado em solução salina e a suspensão foi transferida para meio de cultura sólido através de estrias. Após 5 dias, colônias isoladas foram transferidas para novo meio para obtenção de cultura pura e preservação em tubo de estoque com ágar sólido inclinado sob óleo mineral esterilizado.

### **Bioensaio 5: Teste de eficiência de nodulação de cada estirpe em tubos de ensaio**

Este ensaio foi conduzido utilizando-se tubos de ensaio de vidro, 30x3cm, à temperatura de 25°C, com os seguintes tratamentos: (i) Controle – sem inoculação, (ii) 2 estirpes provenientes de nódulos de cada planta avaliada (Figura 02). O substrato utilizado foi mistura de solução nutritiva com ágar. Foi realizado o mesmo procedimento descrito no bioensaio 2. Após 60 dias de crescimento, avaliou-se a nodulação.



**Figura 02.** Teste de eficiência de nodulação em tubos de ensaio.

### **Bioensaio 6: Isolamento e Seleção de Rizóbios específico para Cratília (*Cratylia mollis* Benth)**

As sementes da leguminosa pertencentes a espécie Cratília (*Cratylia mollis* Benth) foram plantadas em vasos contendo aproximadamente 1,5Kg de solo, sem inoculação prévia. Após 60 dias de crescimento em casa de vegetação, foram

coletados nódulos de cada planta para isolamento de bactérias, como descrito no bioensaio 4.

## Resultados e Discussão

A avaliação da pureza de rizóbios em inoculantes (bioensaio 1) resultou em 19 isolados, demonstrando a presença de mais de uma estirpe por inoculante. O teste de eficiência de nodulação (número de nódulos) dessas estirpes em vasos de areia lavada (bioensaio 2) (Figura 03) demonstrou alta eficiência das estirpes A para *Mucuna-Preta*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis*, e das estirpes B para o Guandu e *Crotalaria juncea*. Entretanto, os vasos controle do Feijão-caupi e da

*Crotalaria juncea* apresentaram grande quantidade de nódulos, que pode ser devido ao fato de a areia utilizada não ter sido autoclavada e/ou por não apresentar grande quantidade de estirpes nativas ou ainda pela competição das estirpes nativas com as estirpes dos vasos inoculados. Já o teste de eficiência de nodulação dessas mesmas estirpes em vasos de areia lavada com terra 1:1 (bioensaio 3) (Figura 04) apresentou alta eficiência das estirpes A e B da *Crotalaria Spectabilis*. O guandu também teve alta média de nódulos, mas como no vaso controle não houve germinação, não se pode afirmar sua eficiência. O vaso controle da *crotalaria juncea* apresentou grande número de nódulos, provavelmente por tratar-se de um substrato não autoclavado ou ainda por contaminação externa.

O reisolamento de bactérias a partir dos nódulos de plantas cultivadas (bioensaio 4) resultou em 11 estirpes isoladas. No teste de eficiência de nodulação dessas novas estirpes realizado em tubos de ensaio (bioensaio 5) não ocorreu nodulação provavelmente por se tratar de espécies perenes de tratamento lento e que nodule em tempo maior que no tempo utilizado na avaliação, indicando a necessidade de se esperar um tempo maior para avaliação nessas condições. O isolamento (etapa ainda em andamento) de bactérias da *Cratília* (bioensaio 6) já resultou na obtenção de 1 estirpe isolada candidata para formação de inoculante para essa espécie.

## Conclusão

As atividades desenvolvidas resultaram no isolamento de 31 estirpes de bactérias com características semelhantes às estirpes de rizóbio.

O teste de pureza permitiu a disponibilidade dessas estirpes para cada uma das espécies mencionadas para atender demandas experimentais de ensaios com leguminosas da Embrapa Milho e Sorgo.

A estirpe obtida para a *Cratília* pode ser candidata à formulação de inoculante para essa espécie.

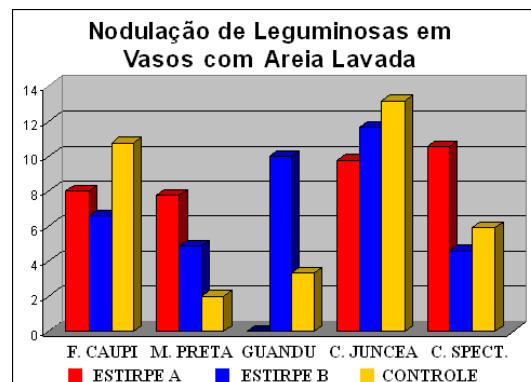


Figura 03. Média de nódulos/planta cultivada em vasos de areia lavada.

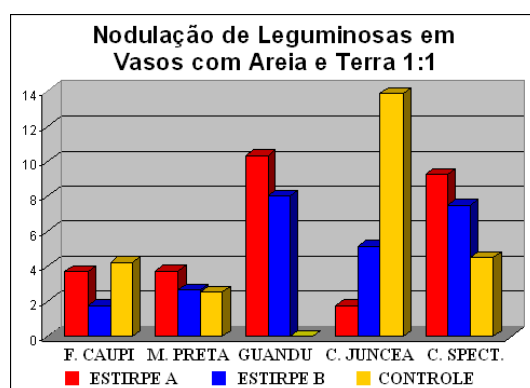


Figura 04. Média de nódulos/planta cultivada em vasos de areia e terra 1:1.

## Referências

ASSOCIAÇÃO DE AGRICULTURA ORGÂNICA. **O que é agricultura orgânica**. Disponível em: <<http://www.aao.org.br/historia.asp>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

FARIA, S. M. de; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 158).

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Goiania: Embrapa-CNPAF; Londrina: Embrapa-CNPSO; Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 542 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 46).

MARTINS, C. R.; PEREIRA, P. A. de P.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre: a importância na química da atmosfera. **Química Nova**, v. 5, n. 3, 2003. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=7>>. Acesso em: 1 de mar. 2010.

RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; SANTOS, C. E. dos; MARTINS, C. M. **Impacto do uso do Rhizobium no rendimento de feijão-caupi**. Terezina: CONAC, 2009. Mini-curso.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R. F. **Leguminosas graníferas**. Viçosa: UFV, 2001. 206 p.

### Outras Atividades Desenvolvidas no Período de Vigência da Bolsa

- Análises de Fosfatase ácida e alcalina, Arginase e Urease das amostras de solo de ensaios visando testes de Inoculante em cultivares de sorgo para substituição da Adubação Nitrogenada.
- Análises de Fosfatase ácida e alcalina, Arginase e Urease das amostras de solo tratados com Dejetos Suínos.
- Análises de Fosfatase ácida e alcalina, Arginase e Urease das amostras de solo tratados com Pó de Balão
- Treinamento em Análise da diversidade metabólica de bactérias através do método BIOLOG.
- Preparo de Meios de Culturas específicos para isolamento de bactérias, fungos e actinomicetos.
- Treinamento em Método para avaliação quantitativa de comunidades microbianas em amostras de solo sob diferentes tipos de manejo.
- Treinamento em extração de DNA total de microrganismos do solo
- Treinamento em avaliação da diversidade genética de micro-organismos em amostras de solo utilizando DGGE
- Treinamento em amplificação de amostra de DNA por técnica de PCR.