



**Levantamento de Rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

*Ernesto Paterniani*

*Hélio Tollini*

Membros

**Diretoria Executiva**

*Silvio Crestana*  
Diretor Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores Executivos

**Embrapa Agrobiologia**

*José Ivo Baldani*  
Chefe Geral

*Eduardo Francia Carneiro Campello*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Rosângela Straliozzo*  
Chefe Adjunto Administrativo



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-8498

Dezembro/2005

## **Documentos 204**

### **Levantamento de Rizóbios em Adubos Verdes Cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**

Alanir Ebison Bratti  
Gustavo Ribeiro Xavier  
Norma Gouvêa Rumjanek  
Claudia Miranda Martins  
Jerri Edson Zilli  
José Guilherme Marinho Guerra  
Dejair Lopes de Almeida  
Maria Cristina Prata Neves

*Seropédica – RJ*  
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Rosa Maria Pitard e José Antônio Azevedo  
Espindola

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2005): 50 exemplares

B824l Bratti, Alanir Ebison.

Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) / Gustavo R. Xavier; Norma G. Rumjanek; Claudia M. Martins; Jerri E. Zilli; José Guilherme M. Guerra; Dejair L. de Almeida; Maria Cristina P. Neves. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 21 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 204).

ISSN 1517-8498

1. Adubo verde. 2. Rhizobium. I. Xavier, G. R., colab. II. Rumjanek, N. G., colab. III. Martins, C. M., colab. IV. Zilli, J. E., colab. V. Guerra, J. G. M., colab. VI. Almeida, D. L. de, colab. VII. Neves, M. C. P., colab. VIII. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IX. Título. X. Série.

CDD 631.874

© Embrapa 2005

## Autores

### **Alanir Ebison Bratti**

Estudante de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/Embrapa Agrobiologia)  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ  
e-mail:

### **Gustavo Ribeiro Xavier**

Eng. Agrônomo, Dr. em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ  
e-mail: gustavo@cnpab.embrapa.br

### **Norma Gouvêa Rumjanek**

Farmacêutica, PhD em Química Farmacêutica, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ  
e-mail: norma@cnpab.embrapa.br

### **Claudia Miranda Martins**

Eng. Agrônoma, Dr. em Ciência do Solo, bolsista Recém-Doutor CNPq, UFRJ/Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ  
e-mail: claudia.miranda.martins@gmail.com

### **Jerri Edson Zilli**

Eng. Agrônomo, Dr. em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Roraima  
BR 174, km 8 – Distrito Industrial, Cep: 69301-970 – Boa Vista/RR  
e-mail: zilli@cpafrr.embrapa.br

### **José Guilherme Marinho Guerra**

Engenheiro Agrônomo, PhD em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, 23851-970 – Seropédica/RJ  
e-mail: gmguerra@cnpab.embrapa.br

### **Dejair Lopes de Almeida**

Engenheiro Agrônomo, PhD em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, 23851-970 – Seropédica/RJ  
e-mail: dejair@cnpab.embrapa.br

### **Maria Cristina Prata Neves**

PhD em Agricultura e Horticultura pela Universidade de Reading, Inglaterra, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, 23851-970 – Seropédica/RJ  
e-mail: mcpneves@cnpab.embrapa.br

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

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 386-392, 1998.

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe.** Porto Alegre: Genesis, 2000. 100 p.

MARTINS, L. M. V.; RANGEL, F. W.; XAVIER, G. R.; RIBEIRO, J. R. A.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, p. 333-339, 2003.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S.; INGHAM, R. E. Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as green manure. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 25, n. 2, p. 303-311, 1993.

NELSON, J. B.; KING, L. D. Green manure as a nitrogen source for wheat in the Southeastern United States. **American Journal of Alternative Agriculture**, Greenbelt, v. 11, n. 4, p. 182-189, 1996.

SHARMA; S.; DEV, S. P.; RAMESHWAR; S. S. Effect of green manuring of sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) on rice yield, nitrogen turnover and soil properties. **Crop Research**, Hisar, v. 19, p. 418-423, 2000.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Cap. 8. p. 281-335.

SINGLETON, P. W.; TAVARES, J. S. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1013-1018, 1986.

STAMPFORD, N. P.; ALBUQUERQUE, M. H.; SANTOS, D. R. Aproveitamento do nitrogênio pelo sorgo em sucessão a leguminosas incorporadas em diferentes épocas de corte. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 221-227, 1994.

STOWERS, M. D.; ELKAN, G. H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 80, p. 191-200, 1984.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso da adubação verde e de controle biológico de pragas, bem como no emprego eficiente dos recursos naturais. Infere-se daí que os processos biológicos que ocorrem no sistema solo/planta, efetivados por microrganismos e pequenos invertebrados, constituem a base sobre a qual a agricultura agroecológica se sustenta.

O documento 204/2005 apresenta informações referentes ao levantamento da ocorrência de rizóbios em plantas para adubos verdes cultivadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA). O aporte de nitrogênio via a associação entre as leguminosas empregadas como adubos verdes e rizóbios é um ponto chave para a manutenção de sistemas agrícolas, sobretudo os baseados nos princípios agroecológicos. Entretanto, para se explorar de forma mais otimizada a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é necessário que se conheça a ecologia das bactérias do grupo dos rizóbios presentes cuja diversidade é influenciada pelas condições edafoclimáticas e pela planta hospedeira. A análise realizada mostrou uma alta diversidade de rizóbio sendo observado a ocorrência de especificidade para algumas espécies de leguminosas avaliadas. O conhecimento do padrão de distribuição desses grupos abre novas perspectivas para a seleção de rizóbios específicos para cada tipo de adubo verde, visando a utilização como inoculante para essas culturas. Embora a prática de inoculação de adubos verdes seja ainda pouco difundida nos sistemas agrícolas brasileiros, os avanços indicam que o processo de FBN pode ser otimizado contribuindo assim para a sustentabilidade dos sistemas agroecológicos.

José Ivo Baldani  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	7
2. Material e Métodos.....	9
2.1. Adubos verdes e coleta de nódulos.....	9
2.2. Isolamento e caracterização de bactérias.....	10
3. Resultados e Discussão .....	11
4. Conclusões.....	17
5. Referências Bibliográficas.....	18

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. de; FRANCO, A. A. Adubação verde: parâmetros para avaliação de sua eficiência. In: CASTRO FILHO, C. de; MUZILLI, O. (Ed.). **Manejo integrado de solos em microbacias hidrográficas**. Londrina: IAPAR, 1996. p. 225-242.

FAVARETTO, N.; MORAES, A. de; MOTTA, A. C. V.; PREVEDELLO, B. M. S. Efeito da revegetação e da adubação de área degradada na fertilidade do solo e nas características da palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 2, p. 289-297, fev. 2000.

FERNANDES, M. F.; BARRETO, A. C. **Seleção de rizóbios de tabuleiro costeiros associados a leguminosas para a adubação verde**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 23 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 20).

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. **Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.

HIRSCH, P. R.; JONES, M. J.; MCGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Heavy metals from past application of sewage decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1485-1490, 1993.

JACOBI, U. S.; FLECK, N. G. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de aveia no início do ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 11-19, jan. 2000.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 506 p.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 5/6, p. 1005-1010, 1996.



- ✓ Em termos de especificidade dos grupos de rizóbios isolados dos nódulos foram observadas que as espécies mais específicas foram *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. mucronata* e cunhã e as menos específicas *Crotalaria juncea* e *guandu*.

## 5. Referências Bibliográficas

ALCÂNTARA, F. A. de; FURTINI NETO, A. E.; PAULA, M. B. de; MESQUITA, A. de; MUNIZ, J. A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 2, p. 277-288, fev. 2000.

AMABILE, R. F.; CORREIA, J. R.; FREITAS, P. L. de; BLANCANEUX, P.; RAMOS, J. G. A. Efeito do manejo de adubos verdes na produção de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 8, p. 1193-1199, ago. 1994.

AMABILE, R. F.; FANCELLI, A. L.; CARVALHO, A. M. de. Comportamento de espécies de adubos verdes em diferentes épocas de semeadura e espaçamentos na região dos cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 47-54, jan. 2000.

BIEDERBECK, V. O.; CAMPBELL, C. A.; RASIAH, V.; ZENTNER, R. P.; WEN, G. Soil quality attributes as influenced by annual legumes used as green manure. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 8/9, p. 1177-1185, 1998.

BODDEY, R. M.; SÁ, J. C. de M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 787-799, 1997.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MOREIRA, F. M. S. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: agronomic and ecological applications. In: PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Applied microbial systematics**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 107-134.

## Levantamento de Rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)

Alanir Ebison Bratti  
Gustavo Ribeiro Xavier  
Norma Gouvêa Rumjanek  
Cláudia Miranda Martins  
Jerri Édson Zilli  
José Guilherme Marinho Guerra  
Dejair Lopes de Almeida  
Maria Cristina Prata Neves

### 1. Introdução

A interação entre leguminosas e rizóbios é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), refletido no aumento da produtividade vegetal, na recuperação de áreas degradadas, no incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo. Entretanto, sua principal aplicabilidade, a curto prazo, indiscutivelmente está associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados, através da otimização da FBN com a inoculação de estirpes selecionadas de rizóbio.

Rizóbio é um termo genérico atribuído a bactérias diazotróficas que apresentam a habilidade de fixar o nitrogênio (N<sub>2</sub>) atmosférico quando em associação com determinadas espécies vegetais da família Leguminosae, formando estruturas especializadas, denominadas nódulos a partir da modulação de uma intensa troca de sinais moleculares dependente do genótipo da planta e da bactéria.

Além destes fatores intrínsecos da associação simbiótica, este processo é influenciado pelas características edafo-climáticas, refletindo nas diferentes respostas em relação a sobrevivência, competitividade, faixa hospedeira, especificidade e eficiência

simbiótica das estirpes usadas nos programas de inoculação de sementes.

Por estas razões, o levantamento contínuo deste grupo de bactérias em diferentes plantas hospedeiras deve sempre ser considerado visando a seleção de associações mais eficientes e adaptáveis a situações específicas visando a recomendação para fins biotecnológicos, ampliando a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas.

O uso desta tecnologia de inoculação em leguminosas já é bastante antigo. Porém, nos últimos anos, com o advento de novas opções de agricultura, a exemplo da agricultura orgânica e suas variantes, o interesse por determinadas práticas agrícolas, associadas aos aspectos de regulamentação e normas técnicas que preconizam esse modelo, tem ampliado o potencial do benefício dos processos ecológicos neste setor do agronegócio.

A adubação verde é uma prática agrícola que consiste no plantio de espécies vegetais, tanto de ciclo anual como perenes, em sistema de rotação ou em consórcio com culturas de interesse econômico. O uso de espécies de leguminosas é bastante difundido e tem sido responsável pela maximização da FBN nos sistemas agrícolas.

Esta prática é um processo natural e caracterizada por melhorar as condições químicas, físicas e biológicas do solo, através da redução das perdas por erosão, aumento do teor de matéria orgânica, da capacidade de troca catiônica, da reciclagem dos nutrientes e pelo controle de nematóides e de plantas invasoras (MOJTAHEDI et al., 1993; AMABILE et al., 1994; STAMPFORD et al., 1994; DE-POLLI et al., 1996; NELSON & KING, 1996; BIEDERBECK et al., 1998; ALCÂNTARA et al., 2000; AMABILE et al., 2000; FAVARETTO et al., 2000; JACOBI & FLECK, 2000).

Nesse pressuposto, o aporte de nitrogênio via associação entre leguminosas empregadas como adubos verdes e rizóbios é um ponto chave para a manutenção dos sistemas agrícolas, sobretudo os baseados nos princípios agroecológicos, já que o nitrogênio é o quarto mais abundante elemento na biomassa, após C, O e H

específicos para cada adubo verde, visando a utilização como inoculante para essas culturas.

Um exemplo deste fato é a inoculação do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) com estirpes de rizóbios selecionadas, já que até pouco tempo, os estudos visando a seleção de estirpes para essa espécie eram negligenciados considerando a promiscuidade de nodulação pela população de rizóbio nativo do solo ((RUMJANEK et al., 2005).

MARTINS et al. (1996) analisaram a variabilidade existente na população de rizóbios, inicialmente também a partir da caracterização morfológica dos isolados em meio de cultura seguido de eficiência em casa de vegetação, a partir dos grupos mais discriminantes. A partir desse trabalho, associado à seleção de outras características intrínsecas do rizóbio, como tolerância a antibiótico (XAVIER et al., 1998), foi possível selecionar uma estirpe capaz de alcançar patamares de até 30% de produtividade do feijão-caupi em relação ao controle não inoculado (MARTINS et al., 2003). LACERDA et al., (2004) também observaram incremento na produtividade inoculando caupi com estirpe de rizóbio.

A partir destes estudos prévio de caracterização morfológica dos rizóbios, novos estudos baseados na caracterização genotípica, nos aspectos de ecologia de rizóbio (tolerância a estresse biótico e abiótico), bem como de eficiência e especificidade, serão conduzidos visando a seleção de rizóbios específicos para os adubos verdes.

#### **4. Conclusões**

---

- ✓ As características que mais contribuíram para a análise da caracterização morfológica foram a alteração de pH, tempo de crescimento, tamanho, forma, transparência, elasticidade, tipo de muco da colônia e aparência do muco.
- ✓ A caracterização morfológica dos isolados de rizóbio revelou uma alta diversidade, sendo observado até 30 grupos comuns e 33 grupos raros com até 2 indivíduos, representando 15% da população inicial.

Nas espécies de mucuna, o maior percentual dos isolados encontra-se distribuído nos grupos que apresentam característica de acidificar o meio de cultura e ser de crescimento rápido (até 24 horas, grupo 1 ao 12) (Tabela 2). Quando analisada a distribuição para cada espécie de mucuna, não foi observado uma relação do tipo de rizóbio com a espécie de mucuna. No grupo raro, os 17 indivíduos foram distribuídos em 16 grupos, demonstrando a alta diversidade de rizóbio capaz de nodular o gênero *Mucuna*.

No entanto, mais recentemente (<http://www.ildis.org/legume.web>), as espécies de mucuna, *Stizolobium atterrimum* e *S. pruriens* foram reclassificadas na mesma espécie. Esses dados corroboram a distribuição dos grupos de rizóbios observada neste trabalho.

Já para o gênero *Crotalaria*, foi observada uma distribuição dos isolados em 22 grupos (Tabela 2). Porém, a maior porcentagem observada foi nos grupos 14, 15, 16, 17 e 18, que acidificam o meio, têm crescimento rápido (2 dias) e tamanho de 2 mm e nos grupos 21, 29, 30 e 31.

Quando analisada a distribuição de acordo com as espécies de Crotalária: *C. juncea* (45 isolados), *C. spectabilis* (24 isolados), *C. mucronata* (13 isolados), *C. ochroleuca* (9 isolados) e *C. breviflora* (7 isolados), foi observado efeito nítido da espécie sobre a distribuição desses isolados. Para *C. juncea*, os isolados apresentaram a maior distribuição entre os grupos, apesar de não terem sido observados isolados nos grupos 17, 18, 19, 24 e 30, que foram característicos de outras espécies. Para *C. breviflora*, os isolados foram exclusivos para os grupos 16 e 17.

Isolados com elasticidade foram observados apenas em *C. mucronata*, *C. ochroleuca* e *C. breviflora*. Não foram observados isolados de *C. mucronata*, *C. ochroleuca* e *C. breviflora* nos grupos raros. Em relação a esses grupos, foram obtidos 9 indivíduos, 6 isolados de *C. spectabilis*, demonstrando ser essa espécie capaz de nodular com uma faixa mais ampla.

O conhecimento do padrão de distribuição desses grupos morfológicos pode ser o ponto de partida para a seleção de rizóbios

(LARCHER, 1995) e é considerado o fator que mais influencia na produtividade das culturas (URQUIAGA & ZAPATA, 2000).

Muitos autores têm comprovado o aporte de N, proveniente da FBN, por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, quando se cultivam leguminosas de interesse econômico e como adubos verdes para culturas principais (DE-POLLI et al., 1996; BODDEY et al., 1997; SHARMA et al., 2000, MARTINS et al., 2003), demonstrando o potencial de uso destas associações simbióticas.

Para se explorar de forma mais otimizada a FBN, é necessário que se conheça a ecologia das bactérias do grupo dos rizóbios (RUMJANEK et al., 2005). Porém, não é só o microrganismo que varia de acordo com as alterações do ecossistema. A análise qualitativa mostra que as características fenotípicas dos microrganismos são influenciadas por condições edafo-climáticas específicas, bem como a presença de plantas leguminosas parece ser um forte determinante da diversidade da população de rizóbio (SINGLETON & TAVARES, 1986; HIRSCH et al., 1993).

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade morfológica de rizóbios associados a adubos verdes cultivados em um Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA).

## 2. Material e Métodos

---

### 2.1. Adubos verdes e coleta de nódulos

Raízes noduladas de leguminosas empregadas como adubos verdes, amendoim forrageiro (*Arachis pinto*), cunhã (*Clitoria ternatea*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), guandu (*Cajanus cajan*), crotalarias (*Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, *C. mucronata* e *C. breviflora*) e mucuna anã (*Mucuna deeringiana*) e mucuna cinza (*Mucuna pruriens*), cultivadas sem a prática de inoculação, foram coletadas durante o período de janeiro a junho de 2004 na área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) (Figura 1).

Este sistema (SIPA) é conduzido em parceria entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (através da Embrapa

Agrobiologia e da Embrapa Solos), a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (através da Estação Experimental de Seropédica) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro mantido pela Embrapa Agrobiologia, dando-se ênfase aos processos agrobiológicos preconizados nos sistemas orgânicos de produção agrícola.

Os nódulos de 5 plantas de cada espécie de adubo verde foram retirados das raízes, contados, pesados e estocados em recipientes contendo sílica-gel para a desidratação dos nódulos.



**Figura 1:** Imagem aérea da área do SIPA e em detalhe os locais de implantação dos experimentos. Em destaque, as áreas de glebas. Foto cedida por Ricardo Eiras Moreira da Rocha. (Escala 1:2.000).

## 2.2. Isolamento e caracterização de bactérias

Foi realizado o isolamento de cerca de 5% dos nódulos (pelo menos 10 nódulos) de cada tratamento. Inicialmente, os nódulos foram rehidratados por algumas horas sendo, em seguida, realizada uma

**Tabela 2-** Distribuição dos grupos morfológicos de rizóbios em 2 espécies mucuna e 5 de crotalária.

Grupo Morfológico	Mucuna		Crotalária				
	Anã	Cinza	<i>C. juncea</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. breviflora</i>	<i>C. mucronata</i>	<i>C. ochroleuca</i>
1	5	4	1	-	-	-	-
2	-	6	3	-	-	-	-
3	1	4	1	-	-	-	-
4	-	2	-	-	-	-	-
5	11	18	1	-	-	-	-
6	1	2	2	-	-	-	-
7	8	4	-	-	-	-	-
8	-	1	3	-	-	-	-
9	5	-	3	-	-	-	-
10	1	3	-	-	-	-	-
11	1	1	1	-	-	-	-
12	-	5	-	-	-	-	-
13	-	1	3	-	-	-	-
14	-	-	5	-	-	-	-
15	-	1	4	1	-	-	-
16	-	-	1	3	3	4	5
17	-	-	-	3	4	7	2
18	-	-	-	3	-	1	1
19	-	-	-	1	-	1	1
20	-	1	-	-	-	-	-
21	-	-	6	-	-	-	-
22	-	-	1	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
24	2	1	-	3	-	-	-
25	-	2	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-
28	-	1	1	-	-	-	-
29	-	-	6	-	-	-	-
30	-	-	-	4	-	-	-
31	9	8	3	6	-	-	-

Em *Clitoria ternatea*, a distribuição dos 16 isolados analisados foi observada somente nos grupos 26, 27, 28 e 31. Esses grupos foram dominantes apenas para essa espécie e no caso do grupo 26, também, exclusivo.

Em *Cajanus cajan*, os 40 isolados foram distribuídos em 12 grupos, porém a maior porcentagem foi observada nos grupos 1, 5, 23, 24, 28, 29 e 31. Esses grupos, em sua maioria, têm característica de alcalinizar o meio de cultura, apresentar crescimento lento e colônias menores que 1mm.

Em um outro estudo visando a seleção de rizóbios, adaptados às condições dos Tabuleiros Costeiros e a alta capacidade de FBN em guandu, feijão-de-porco e caupi, FERNANDES & BARRETO (2001) obtiveram 66 isolados, dos quais foram selecionados 4 para guandu e 3 para feijão-de-porco. Estes dados indicam ser possível selecionar bactérias para estes tipos de leguminosas.

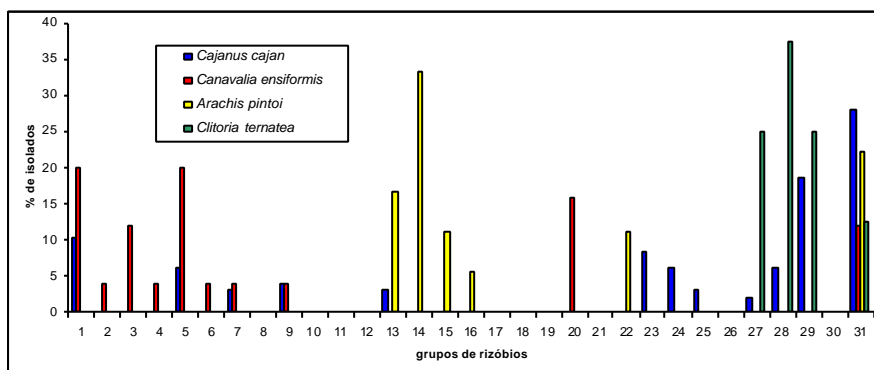


Figura 2- Distribuição percentual dos grupos morfológicos de rizóbios em feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), amendoim forrageiro (*Arachis pinto*), cunhã (*Clitoria ternatea*) e guandu (*Cajanus cajan*).

lavagem com etanol (p.a.) durante 30 segundos, para reduzir a tensão superficial, seguida de uma desinfestação superficial com hipoclorito de sódio (5%) durante 4 minutos e 10 lavagens com água destilada esterilizada.

Os nódulos desinfestados assepticamente foram pressionados com uma pinça sobre o meio YMA (FRED & WAKSMAN, 1928), contendo azul de bromotimol (0,5%), em placa de Petri. Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias isoladas, quando as mesmas foram repicadas para novas placas, contendo o mesmo meio, a fim de proceder a sua purificação e caracterização, e incubadas a 28°C. Nesta etapa, o aparecimento das colônias nas placas foi observado do primeiro ao sexto dia após a repicagem.

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada segundo VINCENT (1970), avaliando-se o tempo de crescimento de cada um dos isolados, sendo considerado: crescimento lento (quatro ou mais dias) ou rápido (até três dias); pH do meio após o crescimento das bactérias, observado pela coloração do meio da cultura, contendo azul de bromotimol (alcalino, ácido e neutro); tamanho (mm); forma (circular ou irregular); elevação (plana ou com elevação); borda (inteira ou irregular); transparência (opaca ou transparente); aparência (homogênea ou heterogênea) e cor (branca ou amarela). Quanto ao muco produzido, foram avaliados os aspectos quanto a: quantidade (muito ou pouco); aderência à alça de platina, observada pela remoção do muco da superfície do meio de cultura (limpando ou não); e elasticidade, observada pela formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura (1= sem elasticidade, 2= elasticidade até 0,5 cm, 3= elasticidade acima de 0,5 cm).

### 3. Resultados e Discussão

Foram isolados e caracterizados morfológicamente 306 estirpes de rizóbio (Tabela em anexo). Essas estirpes foram agrupadas de acordo com as características culturais que mais as diferenciavam: tempo de crescimento; pH do meio após o crescimento das

bactérias; tamanho da colônia, forma, transparência, elasticidade e aparência do muco.

Desse agrupamento, foram obtidos 31 grupos morfológicos, relacionados na Tabela 1. O maior número de indivíduos foi observado no Grupo 5, com 37 isolados. O Grupo 31, com 46 isolados, representa o somatório de 33 grupos raros com 1 ou 2 indivíduos cada. Esses dados demonstram a diversidade de grupos de rizóbios associados com adubos verdes no SIPA.

Dentre os 306 isolados obtidos de nódulos das espécies estudadas, 68% acidificaram o meio de cultura. A reação de mudança de pH em meio de cultura YMA é, habitualmente, consistente dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que apresentam a característica de acidificar o meio de cultura. Porém, em alguns casos, o pH não é modificado, enquanto que *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA (COUTINHO et al., 2000).

As características morfológicas de rizóbio fornecem importantes informações para sua identificação e agrupamento, destacando-se, entre várias outras características o tempo de crescimento e a reação de pH em meio de cultura (STOWERS & ELKAN, 1984).

Em relação à característica de tempo de crescimento em placa, cerca de 70% dos isolados apresentaram crescimento rápido (até 3 dias), dos quais 46% foram capazes de crescer em até 24hs.

Para verificar possíveis padrões de distribuição dos isolados de rizóbio com a espécie de planta, foram comparados a distribuição dos isolados nos 31 grupos para cada espécie de adubos verdes (Figura 2 e Tabela 2).

Na leguminosa *Canavalia ensiformis*, com 25 isolados, e para o *Arachis pintoi*, com 18 isolados, o maior percentual de isolados foi observado nos grupos 1, 3, 5, 20, 31, e nos grupos 13, 14, 15, 22, 31, respectivamente. Esses grupos têm em comum a capacidade de acidificar o meio e apresentar crescimento rápido, diferindo-se principalmente em relação a transparência e tipo de muco.

**Tabela 1- Características dos grupos morfológicos.**

Grupo	Nº de indivíduos	pH	Tempo (dias)	Tamanho (mm)	Forma	Transparência	Elasticidade	Aparência
1	19	Ácido	1	1	Circular	Opaca	1	Heterog.
2	10	Ácido	1	1	Circular	Opaca	1	Homog.
3	9	Ácido	1	1	Circular	Transparente	1	Heterog.
4	3	Ácido	1	1	Irregular	Transparente	1	Heterog.
5	37	Ácido	1	2	Circular	Opaca	1	Heterog.
6	6	Ácido	1	2	Circular	Opaca	1	Homog.
7	14	Ácido	1	2	Circular	Transparente	1	Heterog.
8	4	Ácido	1	2	Circular	Transparente	1	Homog.
9	11	Ácido	1	2	Irregular	Opaca	1	Heterog.
10	4	Ácido	1	2	Irregular	Transparente	1	Heterog.
11	3	Ácido	1	3	Circular	Opaca	1	Heterog.
12	5	Ácido	1	2	Circular	Opaca	1	Heterog.
13	8	Ácido	2	1	Circular	Opaca	1	Heterog.
14	11	Ácido	2	2	Circular	Opaca	1	Heterog.
15	8	Ácido	2	2	Circular	Opaca	1	Homog.
16	17	Ácido	2	2	Circular	Transparente	1	Heterog.
17	16	Ácido	2	2	Circular	Transparente	1	Homog.
18	5	Ácido	2	2	Circular	Transparente	2	Heterog.
19	3	Ácido	2	2	Circular	Transparente	2	Homog.
20	5	Alcalino	2	<1	Circular	Opaca	1	Heterog.
21	6	Alcalino	5	<1	Circular	Opaca	1	Heterog.
22	3	Alcalino	5	<1	Circular	Opaca	1	Homog.
23	3	Alcalino	5	<1	Circular	Transparente	1	Heterog.
24	9	Alcalino	5	<1	Circular	Transparente	1	Homog.
25	3	Alcalino	8	1	Circular	Transparente	1	Homog.
26	4	Alcalino	8	<1	Circular	Opaca	1	Homog.
27	7	Alcalino	8	<1	Circular	Transparente	1	Heterog.
28	8	Alcalino	8	<1	Circular	Transparente	1	Homog.
29	15	Alcalino	8	<1	Irregular	Opaca	1	Heterog.
30	4	Alcalino	8	<1	Irregular	Opaca	1	Homog.
31	46	*	*	*	*	*	*	*

Legenda: elasticidade- 1 (sem elasticidade); 2 (com elasticidade)