

11166 - Fenótipo de bactérias isoladas de nódulos de *Crotalaria* spp. cultivadas num sistema de produção agroecológica

Phenotypes of bacteria isolated from nodules of Crotalaria spp. grown in agro-ecological production systems

NOSOLINE, Sumaya¹; PAULO, Fernanda¹; LEITE, Jakson¹; LIMA, Andréa¹; RUMJANEK, Norma²; XAVIER, Gustavo²

1 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, maya_joaca@yahoo.com.br; nandasibila@yahoo.com.br; leitejk@yahoo.com.br; andrea_ap_lima@yahoo.com.br

2 Embrapa Agrobiologia, norma@cnpab.embrapa.br, gustavo@cnpab.embrapa.br

Resumo: A adoção de práticas conservacionistas contribui para a recuperação da fertilidade dos solos, proporcionando uma redução do uso de fertilizantes sintéticos. Devido a capacidade de formar nódulos com ampla faixa de rizóbio, tem-se utilizado a adubação verde com leguminosas para ciclagem de nutrientes e disponibilização de nitrogênio para as plantas. Nesse contexto, a identificação da população nativa de rizóbio associada aos adubos verdes pode ser um instrumento para melhorar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio nos sistemas agrícolas. O trabalho objetivou caracterizar morfológicamente bactérias isoladas de nódulos de três espécies de *Crotalaria*, oriundas de área de cultivo orgânico. Após a coleta dos nódulos, procedeu-se ao isolamento e à caracterização morfológica. A análise estatística dos parâmetros morfológicos deu origem a um dendrograma de similaridade. Os isolados foram divididos em 17 grupos culturais, a maioria deles diferentes das estirpes referência utilizadas. Tempo de crescimento rápido e metabolismo ácido no meio de cultivo foram as características mais comuns entre os isolados. Ocorreu relação entre agrupamento e origem dos isolados, sendo os isolados pertencentes aos grupos I, J, K, L e M comuns às três espécies.

Palavras -Chave: adubação verde, caracterização morfocultural, FBN

Abstract: The adoption of conservation practices contributes to soil fertility recovery, providing a reduction in the use of synthetic fertilizers. Because of the ability to form nodules with a wide range of rhizobia, green manure legumes have been used to improve nutrient cycling and nitrogen availability for plants. In this context, the identification of the native rhizobial population associated with green manures can be a tool to improve the contribution of biological nitrogen fixation in agricultural systems. This study aimed to characterize the morphology of bacteria isolated from nodules of three *Crotalaria* species cultivated in organic farming areas. After collecting the nodules, we proceeded to the isolation and characterization. Statistical analysis of morphocultural parameters has resulted in a similarity dendrogram. The isolates were divided into 17 cultural groups, most of them different from the reference strains used. Most isolates were characterized as rapid growing and acid producing in culture medium. There was a relationship between morphocultural grouping and source of isolates, and isolates belonging to groups I, J, K, L and M were common to the three plant species.

Key Words: green manure, morphocultural characterization, BNF

Introdução

A adubação verde vem sendo utilizada para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos através da incorporação de matéria orgânica e ciclagem de

nutrientes das camadas profundas do solo para a superfície, em formas assimiláveis pelas plantas cultivadas (BERTONI *et al.*, 1972; SAMAPIO & MALUF, 1999). Esta prática promove a recuperação da fertilidade, a disponibilização de nitrogênio para as plantas e minimiza a degradação dos solos, em termos de sua agregação e estruturação, além de controlar plantas invasoras (CREWS e PEOPLES, 2004; ESPINDOLA *et al.*, 2005).

Plantas de diferentes famílias botânicas podem ser utilizadas como adubos verdes, porém, as leguminosas são de uso mais frequente por serem encontradas em grande diversidade de climas, devido à capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas (Fixação Biológica de Nitrogênio) e por possuírem raízes bem ramificadas e profundas (MYIAZAKA, 1984; KIEHL, 1985).

Por apresentar uma alta produção de massa vegetal, *Crotalaria* spp. são muito utilizadas como adubos verdes e sua associação com rizóbios pode suprir total ou parcialmente o teor de nitrogênio necessário ao bom desenvolvimento da planta, reduzindo assim o uso de fertilizantes minerais (CASTRO *et al.*, 2005).

A identificação e seleção de rizóbio a partir da população nativa capaz de estabelecer associação com adubos verdes pode, além de revelar uma diversidade microbiana muito grande, ser instrumento para melhorar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio nos sistemas agrícolas, através do isolamento de bactérias com elevado potencial simbiótico (FERNANDES JÚNIOR, 2009).

Neste contexto, objetivou-se caracterizar a morfologia de colônias de bactérias isoladas dos nódulos de três espécies de *Crotalaria*, oriundas de área de cultivo orgânico.

Metodologia

Nódulos foram coletados de raízes de *Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca* e *C. mucronata* cultivadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA, Fazendinha Agroecológica Km 47, localizada em Seropédica - RJ) e foram submetidos à desinfestação superficial, conforme VINCENT (1970). Em seguida, as bactérias foram isoladas em placas com meio YMA (VINCENT, 1970), também conhecido como 79, contendo vermelho congo (0,25%), com o objetivo de separar rizóbios de possíveis contaminantes. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias isoladas. Essas foram selecionadas e plaqueadas para novas placas de Petri, contendo o meio YMA, com o indicador Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH: 5ml) e pH 6,8 (FRED & WAKSMAN, 1928), e incubadas a 28°C, para purificação. Após a purificação dos isolados, foram avaliadas as seguintes características culturais: alteração do pH do meio de cultura (alcalino, ácido e neutro); tempo de crescimento, avaliado pela presença de colônias isoladas (lento: 4 ou mais dias; rápido: até 3 dias); características das colônias (tamanho: mm; elevação: plana, lenticular ou convexa; cor: branca, amarela, creme) (VINCENT, 1970). Cinco estirpes referência foram usadas como padrão de crescimento no meio YMA: *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571 = BR 5410); *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29); *Mesorhizobium ciceri* (USDA 3383 = BR 521); *Rhizobium tropici* (CIAT 899 = BR 322) e *Sinorhizobium fredii* (USDA 205 = BR 112). Essas estirpes foram obtidas do banco de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. Uma matriz binária de dados foi construída com os isolados de cada espécie de crotalária e as estirpes referência. Os isolados foram comparados por seu grau de similaridade estimado pelo coeficiente de

Jaccard (Sj), agrupados pelo método UPGMA e representados graficamente por um dendrograma obtido pelo programa PAST.

Resultados e discussão

Foram obtidos 145 isolados, dos quais 47 estavam associados à *Crotalaria juncea*, 50 à *C. mucronata* e 48 à *C. ochroleuca*. Os isolados mostraram características culturais que permitiram reuni-los em 17 grupos culturais com níveis de similaridade de 100% (Figura 1).

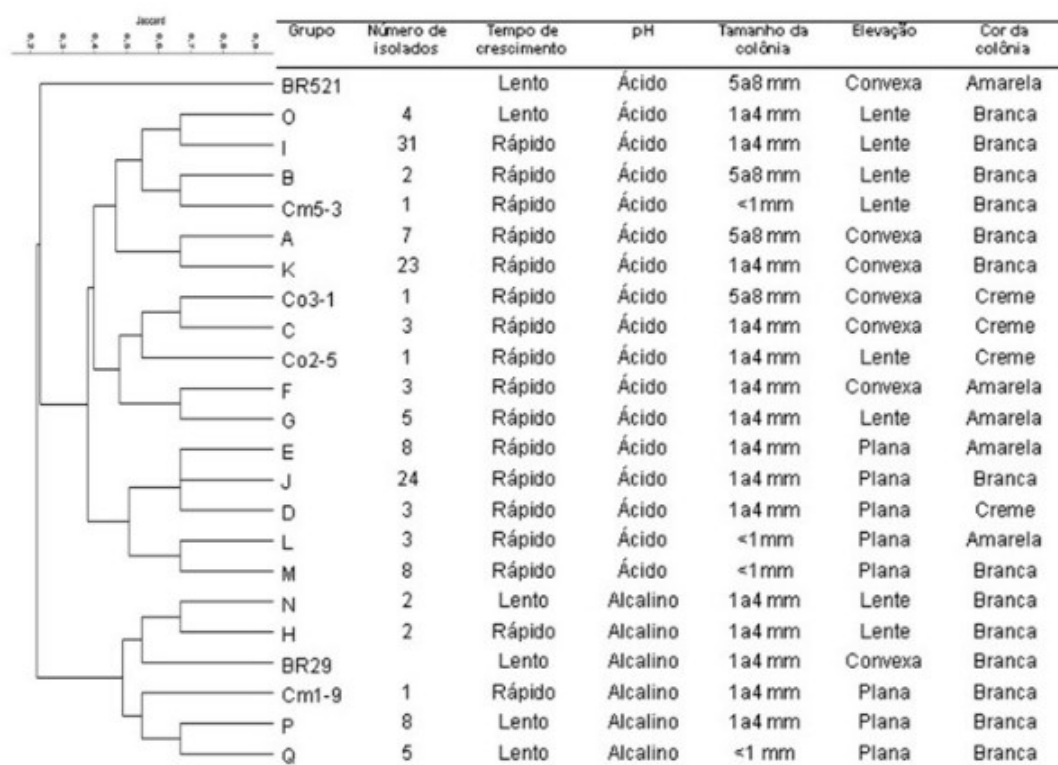


Figura 1. Dendrograma de similaridade entre grupos culturais de bactérias isoladas de nódulos de *Crotalaria* spp.

Os grupos mais abundantes foram I, J e K, apresentando como características mais comuns entre seus isolados: tempo de crescimento rápido, metabolismo ácido para reação do pH em meio de cultivo e tamanho de colônia variando de 1 a 4 mm. O tempo de crescimento e a reação do pH em meio de cultura são características morfológicas muito utilizadas no agrupamento de bactérias e, de acordo com STOWERS & ELKAN (1984), são as mais importantes na identificação e agrupamento de rizóbios. BRATTI et al. (2005) fizeram outro levantamento de rizóbios associados à adubos verdes, também cultivados em áreas do SIPA, observando predomínio, cerca de 70%, de isolados de crescimento rápido.

Os isolados do grupo F mostraram padrão de crescimento no meio YMA igual ao das estirpes *Rhizobium tropici* BR 322 (=CIAT 899) e *Sinorhizobium fredii* BR112 (=USDA 205). Estas duas estirpes apresentam crescimento rápido e reação ácida do pH no meio de cultivo. COUTINHO et al. (2000) concluíram que a mudança de pH em meio de cultura YMA é, geralmente, consistente dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e

Sinorhizobium, que apresentam a característica de acidificar o meio de cultura. Enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA. A estirpe de *Mesorhizobium ciceri* BR521 (=USDA 3383) mostrou padrão de crescimento muito distinto dos isolados obtidos.

Os isolados Cm1-9, Cm5-3, Co2-5 e Co3-1 apresentaram fenótipos distintos dos demais isolados e com as estirpes referência, não se agrupando. A distinção fenotípica no meio YMA destes isolados em relação às estirpes referência pode indicar a possibilidade de serem microssimbiontes ainda não descritos ou representantes de outras espécies, fazendo-se necessários estudos futuros envolvendo as etapas de caracterização polifásica envolvendo abordagens genotípicas, bioquímicas e fisiológicas.

O grupo N apresentou padrão de crescimento comum ao da estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* BR 29. O grupo H mostrou características que a indicam se assemelhar a estirpe *Azorhizobium doebereinae* (UFLA1-100), crescimento rápido e reação do pH em meio alcalina, fenótipo comum dessa espécie (MOREIRA et al., 2006).

Quanto à presença de grupos associados às diferentes espécies de crotalaria, verificou-se relação entre os agrupamentos e a origem dos isolados (Figura 2).

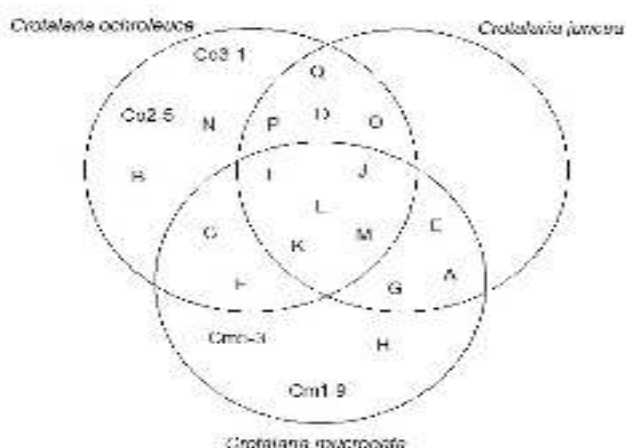


Figura 2. Distribuição de grupos culturais de bactérias isoladas de nódulos de *Crotalaria* spp.

Os isolados pertencentes aos grupos I, J, K, L e M foram comuns às três espécies. As bactérias pertencentes a estes grupos são de crescimento rápido e metabolismo ácido, fenótipo frequentes entre os isolados. Os isolados Co2-5 e Co3-1, que mostraram perfil cultural único (Figura 1) foram obtidos de nódulos de *Crotalaria ochroleuca*, enquanto os isolados Cm1-9 e Cm5-3 foram isolados de nódulos de *Crotalaria mucronata*. Os isolados obtidos de *Crotalaria juncea* apresentaram fenótipo em meio de cultivo semelhante aos isolados de *Crotalaria ochroleuca* e *Crotalaria mucronata*. Este padrão de distribuição dos isolados, segundo o padrão de crescimento em meio de cultivo, entre as três espécies de crotalaria pode revelar um nível de discriminação entre as populações de bactérias do solo que podem nodular as diferentes espécies. Um teste de inoculação cruzada pode

revela se há distinção entre a faixa hospedeira das três espécies e revelar qual pode estabelecer associação com uma faixa mais ampla.

Conclusões

As características culturais possibilitaram a separação dos isolados em 17 grupos fenotípicos distintos, sendo tempo de crescimento e reação de pH no meio de cultivo as mais frequentes.

As espécies *Crotalaria ochroleuca* e *Crotalaria mucronata* mostraram isolados com padrão fenotípico mais distinto.

Bibliografia Citada

BRATTI, A. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, C. M.; ZILLI, J. E; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D. L. DE; NEVES, M. C. P. **Levantamento de Rizóbios em Adubos Verdes Cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**, Embrapa Agrobiologia, 2005 (DOCUMENTO 204).

BERTONI, J; PASTANA, F.I.; LOMBARDI NETO, F.; BENATTI JUNIOR, R. **Conclusões gerais das pesquisas sobre conservação do solo no Instituto Agrônomo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1972. 56p. (Instituto Agrônomo. Circular, 20).

CASTRO, C.M.; ALMEIDA, D.L.; RIBEIRO, R.L.D. CARVALHO, J.F. Plantio direto, adubação verde e suplementação com esterco de aves na produção orgânica de berinjela. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.495-502, 2005.

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.

CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 102, p. 279 – 297, 2004.

FERNANDES JUNIOR, P.I. Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ; 2009 183p. (Tese de Doutorado)

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

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Ceres, 492p., 1985.

MIYASAKA, S; CAMARGO, O. A. de; CAVALIERI, P. A.; GODOY, I. J. de; WERNER, J. C.; CURI, S. M.; LOMBARDI NETO, F.; MEDINA, J. C.; CERVELINI, G. da S.; BULISANI, E. A. **Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas no estado de São Paulo**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 138p.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.;

PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P. *Azorhizobium doebereinae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) **Pers. Systematic and Applied Microbiology.**, v.29, n.1, p.197-206, 2006.

SAMPAIO, M.T & MALUF, W.R. **Adubação Verde: Como contribuir para a saúde da horta, do homem e ainda obter lucro.** Boletim Técnico de Hortaliças nº 38. UFLA. 1ª edição, 1999.