

Foto: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos



## Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet

Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos<sup>1</sup>  
Rosemberg de Vasconcelos Bezerra<sup>2</sup>  
Ana Dolores Santiago de Freitas<sup>1</sup>  
Sirando Lima Seido<sup>3</sup>  
Lindete Míria Vieira Martins<sup>4</sup>  
Norma Gouvea Rumjanek<sup>5</sup>  
Gustavo Ribeiro Xavier<sup>5</sup>

A rizobiologia desenvolveu-se graças aos preceitos dos postulados de Koch, que se baseiam na associação entre bactéria e hospedeiro, isolamento, inoculação, reprodução de sintomas e reisolamento do agente causal.

Desde os primórdios desse tipo de pesquisa, a comprovação da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas considerou a necessidade de evitar contaminações nas condições experimentais, muitas vezes, rigorosas, que impediam sua comprovação pela contaminação por nitrogênio (ATLAS e BARTHA, 1993). Além disso, a contaminação por bactérias diazotróficas não-alvo representa um elemento de cautela, já que esses microrganismos são capazes de viver saprofiticamente no ambiente.

Tradicionalmente, o mecanismo de avaliação da eficiência e da eficácia de estirpes, em condições assépticas, baseia-se no uso de vasos de Leonard, que consistem de garrafas de vidro, cortadas em sua parte inferior, colocadas em posição invertida, dentro de

outras garrafas de vidro de diâmetro maior, preferencialmente, ambas, em vidro ambar. Opcionalmente, outras formas de materiais surgiram como alternativa, como frascos de vidros (400 a 600 mL), tubos (de aproximadamente 200 x 25 mm), sacos plásticos (com cerca de 0,12 mm de espessura e 130 x 14 mm) e papel germiteste (em torno de 230 x 120 mm) (REUNIÃO..., 2007).

Entretanto, um dos grandes problemas encontrados em laboratórios de fertilidade e de microbiologia do solo é a disponibilidade de garrafas adequadas, a confecção e o uso de vasos de Leonard, feitos com garrafas de vidro, que precisam ser cortadas, onerando bastante o processo, pois cada corte custa em torno de R\$ 1,00 (um Real). Para formar um par de vasos de Leonard, são necessárias duas garrafas de vidro.

O presente trabalho teve o objetivo de testar a utilização de garrafas descartáveis tipo Pet em substituição a garrafas de vidro na produção de vasos

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE.

<sup>2</sup> Mestrando Agronomia (Ciências do Solo), Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE.

<sup>3</sup> Mestrando Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Juazeiro, BA.

<sup>4</sup> Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Juazeiro, BA.

<sup>5</sup> Pesquisadores Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. E-mail: norma@cnpab.embrapa.br, gustavo@cnpab.embrapa.br.

de Leonard, visando comprovar a autenticidade de isolados de rizóbio na promoção da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.

Para tal, foi conduzido um experimento em casa de vegetação, em condições estéreis, com a finalidade de testar o uso de garrafas Pet, em substituição às garrafas de vidro, na confecção de vasos de Leonard para validação de estirpes de rizóbios da cultivar de feijão-caupi IPA 206. As garrafas foram cortadas com tesouras, a uma altura de 14-15 cm, a partir da base (Fig. 1). Juntamente com as tampas, passaram por um processo de assepsia, em caixa d'água de 1000 L, com solução de hipoclorito de sódio (5%), tendo permanecido imersas nessa solução por cerca de 1 hora (Fig. 2).

Após esse período, todo o material foi enxaguado com água corrente, para retirar o excesso de hipoclorito e, em seguida, com água destilada e autoclavada, sendo colocado para secar em ambiente asséptico.

Para cada garrafa, usou-se 1,5 kg de substrato, com areia lavada e vemiculita, na proporção de 1:1 (v:v), os quais foram colocados em sacos plásticos de polietileno e levados para a esterilização em autoclave, por uma hora, a 121°C, por dois dias consecutivos. Depois de fria, a mistura autoclavada foi colocada, na parte de cima da garrafa e, na parte de baixo, foi inserida a solução nutritiva de Norris, isenta de nitrogênio (VINCENT, 1970), conforme Fig. 3.

Depois de cheios com o substrato autoclavado, os vasos preparados com garrafas tipo Pet foram cobertos com sacos de papel, com capacidade para 2 kg, e amarrados com barbante, como mostra a Fig. 4, para evitar o desenvolvimento de algas.

As sementes de feijão-caupi foram desinfetadas, superficialmente, por 2 minutos, com álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 2%, por 3 minutos (HUNGRIA, ARAÚJO e JAMES, 1994). Em seguida, foram lavadas por dez vezes, com água destilada e autoclavada. Foram plantadas quatro sementes por vaso. Após sete dias da germinação, foi feito um desbaste, ficando duas plantas por vaso. A inoculação foi feita com 2 mL de inoculante por cada vaso (Fig. 5). Foram utilizadas 11 diferentes estirpes de rizóbio, obtidas de nódulos de feijão-caupi. Adicionalmente, foram utilizados dois controles, sendo uma testemunha sem inoculação e sem N e outra com N (100 mg de N;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  por kg de substrato), com três repetições.



Fig. 1. Altura do corte das garrafas Pet.



Fig. 2. Esterilização das garrafas Pet e das tampas. (Em caixa d'água de 1000 L com solução de hipoclorito de sódio a 5% por um período de cerca de 1 hora).



Fig. 3. Enchimento da parte superior com areia lavada e autoclavada.



Fig. 4. Vasos de Leonard, feitos com garrafas Pet, cobertos com sacos de papel.

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos



O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Os parâmetros avaliados foram massa de nódulos secos e massa da parte aérea seca, aos 50 dias após o plantio. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SAEG.

De acordo com os resultados, pode-se verificar a funcionalidade das garrafas tipo Pet, nos vasos de Leonard, com formação de nódulos nos tratamentos inoculados e ausência de nódulos na testemunha absoluta e na testemunha com N (Fig. 6, Tab. 1). Não foi observada contaminação da testemunha absoluta com N, já que as plantas apresentaram folhas cloróticas, caracterizando deficiência de nitrogênio, ao contrário da testemunha sem inoculação, mas com adição de 100 mg de N na forma de  $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$  por kg de substrato, na qual as plantas apresentaram-se bem desenvolvidas e sem sinais de deficiência de N. O tratamento inoculado, a exemplo da estirpe 331-6, e sem adição de nitrogênio, apresentou um melhor desenvolvimento e uma cor de verde mais intenso, demonstrando a eficiência da estirpe utilizada em fixar nitrogênio molecular (Fig. 6).

Houve diferença significativa entre as estirpes de rizóbio testadas na produção de massa da parte aérea seca e de massa seca de nódulos (Tab. 1), indicando sua funcionalidade para avaliar diferenças entre as estirpes testadas.

Adicionalmente, no processo, não houve necessidade de se utilizar algodão, tão pouco de tecido de morim, para vedar as bocas das garrafas, já que a solução é absorvida pelas plantas por capilaridade e através dos furos, nas tampas rosqueáveis, com a vantagem de não provocar entupimentos, como acontece quando se usa algodão.

Os resultados indicam que é possível a utilização de garrafas tipo Pet em substituição a garrafas de vidro, na preparação de vasos de Leonard, sem prejuízo na condução de experimentos, em condições estéreis, e na validação de estirpes de rizóbios, além de ser um material inerte, leve e resistente e de agregar outras vantagens econômicas, ecológicas e de logística (Tabela 2).

A modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet representa uma alternativa para testar a autenticidade dos isolados de rizóbio em promover a fixação biológica de nitrogênio, já que não foi observada contaminação na testemunha absoluta.



Fig. 5. Inoculação das plântulas de feijão caupi.



Fig. 6. Da esquerda para a direita, testemunha sem inoculação e sem N. (T. absoluta), testemunha sem inoculação e com N. TN  $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$  e tratamento inoculado com a estirpe de rizóbio 331-6.

**Tabela 1.** Massa da parte aérea seca (MPAS) e massa seca de nódulos (MNS) de isolados de rizóbio inoculados na cultivar de feijão caupi IPA 206, aos 50 dias de após o plantio. TN  $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$ , testemunha sem inoculação e com N (100 mg de N;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  por kg de substrato) e T. absoluta, testemunha sem inoculação e sem N.

Isolados	MPAS (g/planta)	MNS (g/planta)
222-1	10,11b	0,71a
471-7	11,30b	0,83a
352-7	12,11b	0,50b
461-4	12,75b	0,48b
532-1	14,74a	0,74a
213-7	14,90a	0,77a
352-10	15,42a	0,71a
331-6	15,94a	0,53b
451-3	16,78a	0,72a
353-6	17,10a	0,50b
111-6	17,29a	0,48b
TN $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$	12,85b	0,0d
T. absoluta	0,31c	0,0c

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos

Foto: Carolina E. Rosália e S. Santos

**Tabela 2.** Vantagens do uso das garrafas Pet em substituição a garrafas de vidro na elaboração de vasos de Leonard.

Característica	Garrafas tipo Pet	Garrafas de vidro
Manuseio	Sem risco de quebrar e mais leves	Maior risco de quebra e mais pesados
Esterilização	Com hipoclorito, não quebra e economia de energia	Por autoclave, muitas quebram e gasto elevado de energia
Consumo de água	Maior consumo, mas pode ser reaproveitada	Consumo apenas no processo de esterilização
Aquisição	Fácil disponibilidade	Menor disponibilidade
Preparo de um vaso	Basta uma garrafa	Necessário duas garrafas
Corte das garrafas	Com tesouras e sem custos	Com aquecedor e pode ter custos no caso de serviço especializado de vidraceiro
Fechamento das garrafas	com as próprias tampas (com pequenos furos)	com algodão e morim
Entupimentos	Menor risco	Maior risco
Acidentes com cortes	Menor risco	Maior risco
Resistência ao impacto	Resistem ao impacto	Não resistem ao impacto
Armazenamento	Menor volume ocupado	Maior volume ocupado

## Referências Bibliográficas

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications** 3.ed. Redwood City: The Benjamin Cumming Publ., 1993. 563 p.

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

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S.; JAMES, E. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa/SPI, 542 p. 1994.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE), 13., 2007, Londrina. Anais... Londrina: **Embrapa Soja**, 2007. p. 29 (Embrapa Soja. Documentos, 290).

### Comunicado Técnico, 124

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agrobiologia**  
**Endereço:** BR465, km7 - Caixa Postal 74505  
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil  
**Fone:** (21) 3441-1500  
**Fax:** (21) 2682-1230  
**Home page:** [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)  
**E-mail:** [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)  
**1ª edição**

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



### Comitê de Publicações

**Presidente:** Norma Gouvêa Rumjanek  
**Secretária-Executiva:** Carmelita do Espírito Santo  
**Membros:** Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.

### Expediente

**Revisão de texto:** Marco Antônio de Almeida Leal e Luis Henrique de Barros Soares  
**Normalização bibliográfica:** Carmelita do Espírito Santo  
**Tratamento das ilustrações:** Maria Christine Saraiva Barbosa  
**Editoração eletrônica:** Marta Maria Gonçalves Bahia