



## Estirpes de Rizóbio Eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio para Leguminosas com Potencial de uso na Recuperação de Áreas Mineradas\*

Keila Caroline Dalle Laste<sup>1</sup>  
Fernando Soares Gonçalves<sup>1</sup>  
Sérgio Miana de Faria<sup>2</sup>

### Introdução

Na exploração dos recursos naturais não renováveis, o setor de mineração destaca-se com um dos mais importantes para a economia nacional e internacional. No entanto, esta atividade quando mal conduzida, compromete o meio ambiente. A atividade de mineração resulta em áreas que podem perder a sua capacidade de resiliência, e com isso necessitam de intervenção antrópica, a fim de reverter os processos de degradação.

As principais fontes de degradação nas atividades de mineração são: a deposição de resíduos ou rejeitos decorrentes do processo de beneficiamento e a deposição do material estéril ou inerte, não aproveitável, proveniente do decapeamento superficial (IBRAM, 1987).

Quando se avalia a relação custo/benefício ambiental, o uso de recursos naturais apresenta a melhor relação quando comparados aos demais métodos de recuperação de áreas degradadas (MACHADO, 2008; MOREIRA E FARIA, 2003). Neste sentido, o uso de leguminosas associadas a microrganismos é uma alternativa para incrementar a revegetação e dar início ao processo sucessional, minimizando as perdas de nutrientes por percolação e erosão; alcançar a auto-suficiência em nitrogênio através da fixação biológica e obter máxima reciclagem de nutrientes no ambiente.

A simbiose mutualista entre planta, bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos, possibilita incorporar C e N ao solo, sendo mais eficientes na absorção de nutrientes, tornando as plantas mais tolerantes aos estresses ambientais (FRANCO e BALIERO, 2000).

A capacidade de se associar com bactérias que formam nódulos e fixam N não é uma característica

de todas as leguminosas. A nodulação tem sido relatada na maioria das espécies da sub-famílias Mimosoideae e Papilionoideae, sendo que na subfamília Caesalpiinoideae, é menos expressiva (FARIA e GUEDES, 1999; BARBERI et al, 1998).

Além disso, estirpes de rizóbio e espécies de leguminosas podem variar de altamente específicas até altamente promíscuas, se são capazes de estabelecer simbiose com poucos parceiros ou com vários parceiros (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Contudo, para o sucesso no uso de recursos naturais para reabilitar áreas alteradas pela atividade de mineração, torna-se necessário um programa de seleção de espécies com potencial de uso na recuperação, bem como estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio e, desta forma, permitir que as plantas hospedeiras se tornem total ou parcialmente independentes da adubação mineral.

A metodologia para seleção de estirpes segue quatro bases de recomendação. Na base de recomendação I, a seleção é feita em condições estéreis em laboratório. A base de recomendação II as estirpes são testadas em vasos Leonard em casa de vegetação, utilizando substrato esterilizado. A base de recomendação III é feita em vasos com solo não estéril. A etapa IV consiste no teste em condições de campo e/ou viveiro das estirpes selecionadas na etapa III (FARIA, 2000).

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com a Companhia Vale do Rio Doce e teve como objetivo selecionar estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas herbáceas e arbustivas de crescimento rápido, *Tephrosia adunca* e *Mimosa xanthocentra* sob base de recomendação II e para *Desmodium leiocarpum*,

\* Apoio Vale, projeto nº 484910



<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica PIBIC/Fapur/Embrapa Agrobiologia, Discente do Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. BR 465, Km 07 Cx Postal 74505. CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: sdfaria@cnpab.embrapa.br

*Tephrosia adunca* e *Mimosa somnians* sob base de recomendação III.

## Material e Métodos

### Experimento em condições estéreis - Base de recomendação II

Os testes utilizando substrato estéril possibilitam comprovar se o isolado é realmente rizóbio e é possível obter uma preliminar avaliação do potencial de fixação de nitrogênio das bactérias. Esta etapa é importante, pois se assemelha de certa forma as áreas de mineração, onde inexistem rizóbios nativos no substrato.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação estéril na Embrapa Agrobiologia. Foram utilizados vasos de Leonard, contendo como substrato areia e vermiculita (2:1v:v) esterilizados (VINCENT, 1970). O vaso de Leonard é formado por duas partes: a superior é constituída de uma garrafa invertida e cortada o fundo onde é colocado o substrato e outra parte inferior, o copo, que serve como base para a primeira e contém a solução nutritiva para as plantas.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Os tratamentos foram: testemunha nitrogenada com adição de três diferentes fontes de nitrogênio mineral:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e  $\text{KNO}_3$ , testemunha absoluta (livre de bactérias e de N mineral) e estirpes de bactérias pertencentes a coleção do laboratório de leguminosas da Embrapa Agrobiologia (Tabela 1).

As sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos, esterilizadas superficialmente em peróxido de hidrogênio 30% e em seguida lavadas com água esterilizada (10x). Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas, que continham filtro de papel e algodão umedecido e levadas a câmara de germinação até a emissão da radícula. Cada vaso de Leonard recebeu quatro plântulas.

No preparo do inóculo, colônias puras de bactérias foram repicadas em tubos contendo 10 mL de meio 79 semi-sólido (FRED e WAKSMAN, 1928). A fim de acelerar a multiplicação, as bactérias ficaram sob agitação horizontal orbital (150 rpm), a temperatura de 27°C.

Após o crescimento das colônias, que variou entre 3 e 7 dias, realizou-se a inoculação. No momento do plantio, adicionou-se com uma pipeta de precisão, 1 mL de inóculo ( $1 \times 10^9$  bactérias/mL) por plântula. Ao fim da inoculação cobriu-se as plântulas com areia estéril.

Após 15 dias foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma plântula por vaso de Leonard. Todos os

tratamentos receberam quinzenalmente solução nutritiva autoclavada (GRUZSMAN e DÖBEREINER, 1968). Semanalmente as testemunhas nitrogenadas receberam doses de nitrogênio mineral contendo 5 mg de N mL<sup>-1</sup>.

Os experimentos foram coletados quando os tratamentos apresentaram diferenciação. A parte aérea foi seca em estufa para obtenção do seu peso. Os nódulos foram retirados manualmente e também secos em estufa e posteriormente foram pesados. A partir dos valores de parte aérea, foi possível calcular a eficiência seguindo a fórmula:

$$\text{eficiência} = \left( \frac{MPAS \text{ trat}}{MPAS \text{ testabs}} \right) \times 100$$

Onde:

*MPAS trat*: massa da parte aérea seca do tratamento;

*MPAS testabs*: massa da parte aérea seca da testemunha absoluta;

e a eficácia segundo a fórmula:

$$\text{eficácia} = \left( \frac{MPAS \text{ trat}}{MPAS \text{ testnitr}} \right) \times 100$$

Onde:

*MPAS trat*: massa da parte aérea seca do tratamento;

*MPAS testnitr*: massa da parte aérea seca da testemunha nitrogenada.

Para este cálculo foram utilizados os valores de rendimento proporcionados pelo tratamento nitrogenado com maior incremento de massa de parte aérea seca.

### Experimentos em condições não estéreis- Base de recomendação III

Dos resultados obtidos nos experimentos em condições esterilizadas, selecionam-se as estirpes e testam-se as mesmas em vasos de solo não estéril com o mesmo hospedeiro.

Esta etapa verifica a eficiência das estirpes inoculadas frente às nativas do solo, onde estas disputam por sítio de infecção na planta hospedeira.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação não estéril da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram utilizados vasos de polietileno contendo 3 kg solo por vaso. O solo utilizado foi Argissolo Vermelho Amarelo procedente do Terraço (área experimental da Embrapa Agrobiologia). Os

tratamentos utilizados foram: testemunha absoluta, testemunha nitrogenada que apresentou maior desenvolvimento em vasos de Leonard e estirpes de bactérias (Tabela 1) também pré-selecionadas no experimento em vasos de Leonard (base de recomendação II).

Os procedimentos com as sementes e o preparo do inóculo foram iguais aos descritos no item anterior. A inoculação foi realizada no momento do plantio adicionando 1mL ( $1 \times 10^9$  bactérias/mL) por plântula.

Semanalmente adicionou-se uma solução contendo 5 mg mL<sup>-1</sup> de N na testemunha nitrogenada. Os experimentos foram coletados quando os tratamentos apresentaram diferenciação. Foram determinadas a massa de parte aérea seca, massa seca de nódulos e massa seca de raiz. Os resultados foram analisados no programa estatístico SISVAR. Para o cálculo da eficiência e eficácia utilizaram-se as mesmas equações descritas anteriormente.

**Tabela 1.** Listagem das estirpes utilizadas nos experimentos, os hospedeiros da qual foram coletados os nódulos e sua região de origem.

Estirpe	Hospedeiro inicial	Local de coleta
BR 1405	<i>Arachis hypogaea</i>	Zimbabwe
BR 2216	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 281	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Rio Grande do Sul
BR 3405	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3432	<i>Mimosa acutistipula</i>	Fortaleza (BA)
BR 3450	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3454	<i>Mimosa scabrella</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3460	<i>Mimosa bimucronata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3461	<i>Mimosa bimucronata</i>	Marliéria (MG)
BR 3462	<i>Mimosa flocculosa</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3463	<i>Mimosa flocculosa</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3464	<i>Mimosa flocculosa</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3466	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3467	<i>Mimosa pelliata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3469	<i>Mimosa camporum</i>	Porto Trombeta (PA)
BR 3470	<i>Mimosa bimucronata</i>	Minas Gerais
BR 3473	<i>Mimosa somnians</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3474	<i>Mimosa somnians</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3477	<i>Mimosa somnians</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3485	<i>Mimosa sp.</i>	Campos do Jordão (SP)
BR 3505	<i>Mimosa sp.</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3506	<i>Mimosa setosa</i>	Porto Trombeta (PA)
BR 3509	<i>Mimosa pigra</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3514	<i>Mimosa setosa</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3522	<i>Mimosa setosa</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3523	<i>Mimosa hostilis</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3608	<i>Acacia mearnsii</i>	Campos do Jordão (SP)
BR 3609	<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3610	<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale -

Estirpe	Hospedeiro inicial	Local de coleta
		Linhares (ES)
BR 3611	<i>Acacia podalyriifolia</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3617	<i>Acacia mangium</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3624	<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3628	<i>Acacia saligna</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3630	<i>Acacia angustissima</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3631	<i>Acacia holosericea</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3632	<i>Acacia farnesiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3634	<i>Acacia melanoxylon</i>	Botucatu (SP)
BR 3804	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3815	<i>Chamaecrista cathartica</i>	Mariana(MG)
BR 3901	<i>Melanoxylum brauna</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4007	<i>Prosopis juliflora</i>	Fortaleza (CE)
BR 4017	<i>Prosopis chilensis</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4101	<i>Ormosia nitida</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 4103	<i>Ormosia nitida</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 4301	<i>Iliandra surinamensis</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4305	<i>Calliandra macrocalyx</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4405	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4406	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4812	<i>Piptadenia stipulacea</i>	UFC
BR 4830	<i>Piptadenia adiantoides</i>	Mariana (MG)
BR 5004	<i>Dimorphandra jorgei</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5005	<i>Dimorphandra jorgei</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5301	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5401	<i>Sesbania virgata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5404	<i>Sesbania marginata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5411	<i>Sesbania exasperata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5609	<i>Falcataria moluccana</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5610	<i>Falcataria moluccana</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5611	<i>Falcataria moluccana</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5613	<i>Albizia procera</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6009	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 6010	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 6205	<i>Albizia saman</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6609	<i>Inga sessilis</i>	Porto Murtinho (BA)
BR 6610	<i>Inga semialata</i>	Mogi Guaçu (SP)
BR 6815	<i>Albizia pedicellaris</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6822	<i>Albizia sp</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 7407	<i>Melilotus officinalis</i>	USA
BR 7409	<i>Medicago sativa</i>	Rio Grande do Sul
BR 7601	<i>Trifolium subteraneum</i>	Rio Grande do Sul
BR 8003	<i>Clitoria fairchildiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8007	<i>Clitoria fairchildiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 814	<i>Leucaena leucocephala</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)

Estirpe	Hospedeiro inicial	Local de coleta
BR 8205	<i>Poecilanthe parviflora</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 824	<i>Leucaena leucocephala</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 827	<i>Leucaena leucocephala</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8601	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8603	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8651	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8653	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8801	<i>Gliricidea sepium</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 9002	<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 9004	<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 96	<i>Glycine max</i>	Rio Grande do Sul
SMF 597-2	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 597-3	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 597-4	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 597-5	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 597-9	<i>Tephrosia sinapou</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)

## Resultados e Discussão

### Experimentos em condições esterilizadas-Base de recomendação II

#### *Tephrosia adunca*

A coleta do experimento ocorreu 121 dias após o plantio. Neste experimento foram testadas 52 estirpes de bactérias e destas, 35 promoveram a nodulação. Ao final do experimento obtiveram-se a massa de parte aérea seca e nódulos eficiência e eficácia das estirpes que promoveram a nodulação (Tabela 2).

Na Figura 1 é possível verificar a diferença visual no desenvolvimento da raiz diante dos três diferentes tratamentos: testemunha absoluta, testemunha nitrogenada e testemunha inoculada de maior MPAS.

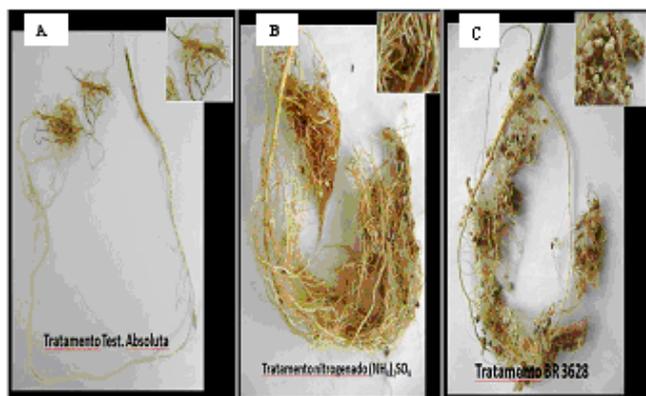


Figura 1. Desenvolvimento da raiz A.tratamento absoluto B.tratamento nitrogenado e C.tratamento inoculado.

**Tabela 2.** Acúmulo de massa da parte aérea seca e de nódulos, eficiência e eficácia dos tratamentos para *T. adunca*

Tratamento	Massa seca		(%)			
	Parte aérea (g)	Nódulos (mg)	Eficiência <sup>1</sup>	Eficácia <sup>2</sup>		
BR 814	0,01	b	0,630	b	25	0,23
BR 3505	0,02	b	0,630	b	50	0,47
BR 9004	0,02	b	2,700	b	50	0,47
BR 6009	0,03	b	8,770	b	75	0,71
T absoluta	0,04	b	0,000	b	100	0,95
BR 3608	0,09	b	2,300	b	225	2
BR 3901	0,25	b	2,670	b	625	5
SMF 597-3	0,31	b	0,730	b	775	7
BR 5401	0,44	b	3,930	b	1100	10
BR 4007	0,46	b	26,90	b	1150	10
BR 7407	0,62	b	18,83	b	1550	14
BR 281	0,79	b	35,23	b	1975	18
BR 3631	0,92	b	43,13	a	2300	21
BR 1405	1,05	b	15,20	b	2625	25
BR 4101	1,17	b	16,30	b	2925	27
BR 4301	1,19	b	23,37	b	2975	28
BR 96	1,27	b	70,27	a	3175	30
BR 3466	1,52	a	5,670	b	3800	36
BR 5610	1,59	a	59,30	a	3975	37
KNO <sub>3</sub>	1,63	a	0,000	b	4075	38
BR 3611	1,64	a	57,20	a	4100	39
SMF 597-2	1,68	a	35,10	b	4200	40
SMF 597-5	1,83	a	25,83	b	4575	43
BR 3509	1,94	a	26,70	b	4850	46
BR 8601	1,95	a	70,87	a	4875	46
BR 3609	2,01	a	86,63	a	5025	47
BR 6815	2,05	a	37,03	b	5125	48
BR 3611	2,17	a	54,90	a	5425	51
BR 4406	2,49	a	42,37	a	6225	59
BR 6822	2,64	a	58,70	a	6600	62
BR 6205	2,84	a	18,13	b	7100	67
BR 5613	2,99	a	63,40	a	7475	71
BR 5004	3,04	a	55,53	a	7600	72
BR 5609	3,31	a	73,67	a	8275	78
BR 5301	3,32	a	87,67	a	8300	79
TN2(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,09	a	0,000	b	10225	97
TN1 (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	4,20	a	0,000	b	10500	100
BR 5303	4,36	a	114,47	a	10900	103
BR 3628	4,40	a	133,73	a	11000	104
%CV	122,20		178,58			

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ( $p=0,05$ )

1.Eficiência=(MPAS trat / MPAS Tabs)\*100;

2.Eficácia=(MPAS trat/ MPAS TN)\*100

Os tratamentos que receberam nitrogênio mineral (825 mg) não diferiram estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott 5%, no entanto a fonte de N que proporcionou o maior incremento de massa de parte aérea seca (MPAS) foi NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Das 35 estirpes de bactérias que induziram a nodulação, dez proporcionaram uma eficácia superior a 50%.

A estirpe BR 5301 apresentou para *Tephrosia adunca* a terceira maior eficiência com desenvolvimento 83 vezes maior que a testemunha absoluta. Resultados encontrados por FRANCO et al. (1996) em experimento com *Tephrosia sinapou* já indicavam a eficiência desta estirpe em fixar nitrogênio neste gênero de leguminosa.

As duas estirpes que proporcionaram o maior incremento de MPAS foram BR 3628 e BR 5303 e apresentaram desenvolvimento 110 e 109 vezes maior que a testemunha absoluta.

A estirpe BR 5303 foi isolada de *Tephrosia sinapou* e se mostrou muito eficiente na contribuição da FBN, comprovando a especificidade da estirpe pelo hospedeiro do mesmo gênero a qual foi isolada.

### *Mimosa xanthocentra*

O experimento foi coletado aos 69 dias após o plantio. Foram testadas 49 estirpes de bactérias e destas, apenas 21 proporcionaram nódulos.

A estirpe BR 3454 isolada de *Mimosa scabrella* promoveu o maior incremento de MPAS mostrando-se eficiente na fixação biológica de nitrogênio. Segundo GONÇALVES et al. (2007), esta estirpe tem boa afinidade com leguminosas da Tribo Mimoseae, mostrando-se eficiente na FBN para *M. artemisiana*, *M. camporun*, *M. somnians* e quando inoculada na própria *M. scabrella*.

Com adição de 200mg, o tratamento mineral  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  proporcionou maior MPAS, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Tabela 3).

### Experimentos em condições não estéreis - Base de recomendação III

#### *Desmodium leiocarpum*

No ensaio de *Desmodium leiocarpum* foram testadas 10 estirpes da coleção Embrapa Agrobiologia. Entre as estirpes testadas estão as de maior eficiência e estirpes escolhidas aleatoriamente que foram testadas em etapa anterior, na base de recomendação II. A coleta ocorreu aos 87 DAP (Figura 2). Os parâmetros analisados estão demonstrados na Tabela 4.

A fonte de N utilizada foi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sendo aplicado 425 mg por vaso. A quantidade de N não foi suficiente para suprir a espécie na sua capacidade máxima de absorção deste elemento, pois o melhor tratamento inoculado teve sua MPAS superior ao tratamento nitrogenado.

**Tabela 3.** Massa da parte aérea seca e dos nódulos secos, eficiência e eficácia das estirpes que proporcionaram nodulação em *M. xanthocentra*.

Tratamento	Massa seca		(%)			
	Parte aérea(g)	Nódulos (mg)	Eficiência <sup>1</sup>	Eficácia <sup>2</sup>		
BR 3632	0.096	c	3,767	b	64	5
BR 6610	0.114	c	1,400	b	76	6
BR 3630	0.126	c	2,033	b	84	6
BR 827	0.146	c	8,467	b	97	8
BR 3467	0.148	c	1,000	b	98	8
T absoluta	0.150	c	0,000	b	100	8
BR 3610	0.163	c	4,500	b	108	9
BR 8801	0.163	c	2,633	b	108	9
BR 5610	0.171	c	3,967	b	114	9
BR 4305	0.198	c	1,160	b	132	10
BR 3624	0.233	c	2,100	b	155	12
BR 9002	0.357	c	3,600	b	238	19
BR 3463	0.389	c	28,53	b	259	21
TN3 (KNO <sub>3</sub> )	0.399	c	0,000	b	266	22
BR 3461	0.490	b	12,43	b	326	27
BR 9004	0.546	b	22,93	b	364	30
BR 3514	0.553	b	21,66	b	368	30
BR 3469	0.554	b	17,80	a	369	30
BR 3509	0.570	b	23,23	a	380	31
BR 3522	0.663	b	27,63	a	442	36
BR 3473	0.730	b	25,33	a	486	40
BR 3523	0.742	b	33,50	a	494	41
BR 3454	0.913	b	31,83	a	608	50
TN1 (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1,063	b	0,000	b	708	58
TN2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,803	a	0,0000	b	1202	100
%CV	100		164			

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ( $p=0,05$ )

1. Eficiência =  $(\text{MPAS TRAT} / \text{MPAS Tabs}) * 100$

2. Eficácia =  $(\text{MPAS TRAT} / \text{MPAS TN}) * 100$



Figura 2. Competitividade das estirpes inoculadas que proporcionaram bom desenvolvimento em *D. leiocarpum*, em substrato não esterilizado.

A estirpe BR 3467 e a estirpe BR 4406 foram as mais eficientes na FBN para *Desmodium leiocarpum* sob base de recomendação III, diferindo das duas

estirpes mais eficientes encontradas sob base de recomendação II.

A estirpe BR 4406 foi isolada de *Enterolobium contortisiliquum* e se mostrou bastante promíscua, pois foi muito eficiente para 14 espécies dentro da família Leguminosae. A estirpe BR 3467 foi isolada de *Mimosa pellita* e se mostrou bastante específica para tribo Mimoseae (GONÇALVES et al., 2007).

**Tabela 4.** Acúmulo de massa da parte aérea seca, nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para *D. leiocarpum*, em vaso com solo.

Tratamento	MSPA (g/planta)	MSN (mg/planta)	MSR (g/planta)	Eficiência <sup>1</sup> (%)	Eficácia <sup>2</sup> (%)
BR 1405	11,06 c	286 a	5,36 a	80	68
BR 8601	11,28 c	327 a	5,54 a	82	69
BR 3405	12,26 c	259 a	4,66 a	89	76
BR 6610	13,33 b	262 a	5,02 a	97	82
Tabsoleta	13,72 b	258 a	5,08 a	100	85
BR 2216	15,01 a	202 a	6,58 a	109	92
BR 6009	15,36 a	224 a	3,62 a	111	95
BR 4301	15,81 a	199 a	7,15 a	115	97
BR 6205	15,88 a	313 a	4,70 a	115	98
BR 4406	16,10 a	244 a	5,79 a	117	99
TN (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,23 a	187 a	6,75 a	118	100
BR 3467	16,37 a	437 a	7,46 a	119	101
CV%	8,44	45,21	30,29		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ( $p=0,05$ )

1.Eficiência=(MPAS Trat / Tabs)\*100

2.Eficácia=(MPAS Trat / MPAS TN)\*100

### *Tephrosia adunca*

A coleta ocorreu aos 59 dias após o plantio, quando os tratamentos apresentavam diferença visual em altura (Figura 3).



**Figura 3.** Tratamento inoculado, testemunha nitrogenada e testemunha absoluta de *Tephrosia adunca* em vaso de solo não estéril.

Das 6 estirpes testadas, as duas que se destacaram por proporcionar o maior acúmulo de massa de parte aérea seca (MPAS) foram BR 5609 e BR 96, mostrando-se eficientes na competição com os

rizóbios nativos do solo, onde proporcionaram uma eficiência de 142 e 138% e eficácia de 84 e 82% respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5.** Acúmulo de massa da parte aérea seca, de nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para *T. adunca*, cultivada em vaso com solo.

Tratamento	MPAS (g/planta)	MSN (mg/planta)	MSR (g/planta)	Eficiência <sup>1</sup> (%)	Eficácia <sup>2</sup> (%)
BR 3628	1,25 a	5,00 b	0,26 a	53	31
Tabsoleta	2,35 a	18,9 b	0,56 a	100	59
BR3609	2,40 a	11,1 b	0,63 a	102	61
BR 3630	2,65 a	1,90 b	0,56 a	113	67
BR 5303	2,74 a	1,60 b	0,52 a	117	69
BR 96	3,25 a	6,80 b	0,36 a	138	82
BR 5609	3,33 a	39,5 a	0,67 a	142	84
TN (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	3,95 a	0,800 b	0,46 a	168	100
CV%	41,00	134	51,2		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ( $p=0,05$ )

1.Eficiência=(MPAS Trat / MPAS Tabs)\*100

2.Eficácia=(MPAS Trat / MPAS TN)\*100

A estirpe de bactéria BR 3628 proporcionou a menor eficiência e menor acúmulo de massa de parte aérea seca, este resultado diferiu do experimento sob condição estéril, onde esta proporcionou a maior eficiência e maior acúmulo de massa de parte aérea seca (GONÇALVES, LASTE e FÁRIA, 2008). Dentre as seis estirpes testadas somente a BR 3628 proporcionou eficiência e eficácia inferior a 55%, e todas as demais estirpes BR 3609, BR 3630, BR 5303, BR 96 e BR 5609 proporcionaram uma eficiência e eficácia superior a 60%.

A estirpe BR 5609 isolada de *Falcataria moluccana* mostrou ser a mais eficiente para *Tephrosia adunca*, o mesmo foi observado para *Tephrosia sinapou* sob condições estéreis (FÁRIA e FRANCO, 2002). Para os parâmetros avaliados MPAS, MNS e MRS não houve diferença estatística significativa com o teste utilizado, no entanto, a eficiência e a eficácia apresentada pelas estirpes puderam ser claramente observadas.

A aplicação 350mg de nitrogênio mineral reduziu, mas não impediu a nodulação pelas bactérias nativas do solo, o que indica que houve maior demanda da planta por nitrogênio, estimulando a nodulação.

### *Mimosa somnians*

Este experimento teve duração de 100 dias. Os resultados encontrados no experimento estão demonstrados na Tabela 6.

A quantidade de nódulos encontrados na testemunha absoluta sem inoculante e sem nitrogênio mineral indica a presença de estirpes nativas no solo. Este tratamento apesar de não

diferir estatisticamente dos outros resultados, apresentou a menor massa de parte aérea seca (MPAS), mostrando que as estirpes nativas são menos eficiente que as estirpes introduzidas.

A fonte de nitrogênio mineral aplicada foi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , onde, a dose de 725 mg resultou na maior eficiência entre os tratamentos. Esta quantidade de nitrogênio dispensou a formação de nódulos e fixação biológica de nitrogênio pelos microrganismos.

As estirpes BR 3473, BR 3474 e BR 3477 isoladas de *M. somnians*, selecionadas em experimento em condições estéreis, confirmaram sua eficiência em vaso de solo, sob condições não estéreis.

**Tabela 6.** Acúmulo de massa da parte aérea seca, nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para *M. somnians*.

Tratamento	MSPA (g/planta)	MSN (mg/planta)	MSR (g/planta)	Eficiência <sup>1</sup> (%)	Eficácia <sup>2</sup> (%)
Tabsoluta	4,18 a	45,7 a	4,98 a	100	56
BR 3485	4,61 a	18,00 a	2,89 a	110	61
BR 3464	4,70 a	50,00 a	3,17 a	112	63
BR 3470	4,71 a	44,00 a	3,98 a	112	63
BR 3473	5,74 a	102,0 a	3,10 a	137	76
BR 3474	6,43 a	39,70 a	6,82 a	153	86
BR 3477	6,97 a	38,00 a	4,95 a	166	93
TN $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,46 a	0,000 a	9,61 a	178	100
CV%	34,86	124,36	77,46		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ( $p=0,05$ )

1.Eficiência=(MPAS Trat / MPAS Tabs)\*100

2.Eficácia=(MPAS Trat / MPAS TN)\*100

## Conclusão

As estirpes selecionadas com maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio em condições estéreis para *T. adunca* foram BR 3628 e BR 5303 e para *M. xanthocentra* as estirpes BR 3454 e BR 3523. Nos experimentos em condições não esterilizadas as estirpes selecionadas para *D. leiocarpum* foram BR 3467 e BR 4406, para *T. adunca* BR 5609 e BR 96 e para *M. somnians* as estirpes BR 3477 e BR 3474.

## Referências Bibliográficas

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Revista Cerne**, v.4, n.1, p. 145-153, 1998.

FARIA, S. M. de; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999)**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1999. 2 p. (Embrapa-CNPAB. Recomendação Técnica, 5).

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 2000)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia 2000, 10 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 116).

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).

FRANCO, A. A.; BALIERO, F. de C. The Role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C.E., (Ed.). **Transition to global sustainability: the contribution of brazilian science**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2000. 209-234 p.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. de. **Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-Pa**. Seropédica, RJ: EMBRAPA-CNPAB; 71 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 27). 1996.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microrganisms of the soil**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1928. 145 p.

GUZMAN, I; DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1968. p. 46-57

GONÇALVES, F. S.; LASTE, K. C. D.; UCHÔAS, E. S.; BORGES, W. L.; FARIA, S. M. de. **Especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio dentro da família Leguminosae**. In Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 17., 2007, Seropédica, RJ. **Anais...** Seropédica, RJ: UFRRJ.

GONÇALVES, F. S.; LASTE, K. C. D.; FARIA, S. M. de. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para *Tephrosia adunca*. In: FertBio, 2008, Londrina, PR. **Trabalhos...** Londrina-PR: CBCS; Embrapa Soja; IAPAR; UEL, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO - IBRAM. **Mineração e Meio Ambiente**. Belo Horizonte:IBRAM, 1987. 56 p.

MACHADO, R. L.; MOREIRA, J. F.; FARIA, S. M. de. Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas. In; CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Botucatu: SBCS, 2003. 4 p. CD ROM.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.. (International Biological Programme Handbook, 15)

## Comunicado Técnico, 115

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos 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)

1ª impressão (2008): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



## Comitê de publicações

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

## Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Verônica Massena Reis e Luis Henrique Barros Soares  
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.  
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.