

Caracterização morfo cultural de bactérias isoladas de nódulos de espécies de Crotalária



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 276

Caracterização morfocultural de bactérias isoladas de nódulos de espécies de Crotalária

*Sumaya Mário Nosoline
Fernanda Santana de Paulo
Andréa Aparecida de Lima
Jakson Leite
Ednaldo da Silva Araújo
José Guilherme Marinho Guerra
Norma Gouvêa Rumjanek
Gustavo Ribeiro Xavier*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: Luc Marie Felicianus Rouws, Luis Henrique de Barros Soares

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Geraldo Baêta da Cruz

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

CARACTERIZAÇÃO morfofocultural de bactérias isoladas de nódulos de espécies de Crotalaria. / Sumaya Mário Nosoline et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 276).

ISSN: 1980-3075

1. *Crotalaria juncea*. 2. *C. mucronata*. 3. *C. ochroleuca*. 4. Nodulação. I. Nosoline, Sumaya Mário. II. Paulo, Fernanda Santana de. III. Lima, Andréa Aparecida de. IV. Leite, Jakson. V. Araújo, Ednaldo da Silva. VI. Guerra, José Guilherme Marinho. VII. Rumjanek, Norma Gouvêa. VIII. Xavier, Gustavo Ribeiro. IX. Embrapa Agrobiologia. X. Série.

631.84 CDD 23. ed.

Autores

Sumaya Mário Nosoline

Fernanda Santana de Paulo

Mestrandas em Agronomia-Ciência do Solo, UFRRJ.

BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP-23890-000.

E-mails: maya_joaca@yahoo.com.br,

nandasibylla@yahoo.com.br

Andréa Aparecida de Lima

Jakson Leite

Doutorandos em Agronomia-Ciência do Solo, UFRRJ.

BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

E-mails: andrea_ap_lima@yahoo.com.br,

leitejk@yahoo.com.br

Ednaldo da Silva Araújo

José Guilherme Marinho Guerra

Norma Gouvêa Rumjanek

Gustavo Ribeiro Xavier

Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia. BR 467,

km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000. E-mails:

ednaldo@cnpab.embrapa.br,

gmguerra@cnpab.embrapa.br,

norma@cnpab.embrapa.br

gustavo@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação, com a seguinte missão: “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 276 apresenta os resultados de um levantamento de bactérias fixadoras de nitrogênio em uma área onde é praticada a agricultura orgânica a cerca de 20 anos. A busca por insumos biológicos e adubos verdes que possam substituir, parcial ou integralmente, os fertilizantes químicos, sem reduzir a produtividade das culturas agrícolas, ganha uma importância cada vez maior. Os motivos são de ordem econômica, energética e ambiental, já que grande volume dos adubos sintéticos empregados na agricultura depende de matérias primas importadas. Além de que, como no caso do nitrogênio, esses materiais demandam grande quantidade de energia fóssil no processo produtivo e

quando usados em demasia podem contaminar rios, lagos e outros corpos hídricos. O presente documento mostra que existe um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio na área estudada, com potencial de aplicação na produção de inoculantes para plantas utilizadas na adubação verde, como no caso das crotalárias. Bem como, descreve procedimentos básicos para trabalhos de prospecção de microrganismos que podem auxiliar a todos aqueles interessados em informações sobre essa linha de pesquisa.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	9
Área de estudo	11
Amostragem	12
Isolamento de bactérias de nódulos	12
Caracterização dos isolados	13
Avaliação da coleção	13
Referências Bibliográficas	21

Caracterização morfo cultural de bactérias isoladas de nódulos de espécies de Crotalaria

*Sumaya Mário Nosoline
Fernanda Santana de Paulo
Andréa Aparecida de Lima
Jakson Leite
Ednaldo da Silva Araújo
José Guilherme Marinho Guerra
Norma Gouvêa Rumjanek
Gustavo Ribeiro Xavier*

Introdução

Nos trópicos, devido ao intenso cultivo e manejo inadequado, os solos geralmente apresentam suas reservas orgânicas e minerais exauridas e a aplicação de elevados teores de insumos agrícolas, para a manutenção da produtividade das culturas, é a prática agrícola recomendada.

A atual preocupação com o esgotamento dos recursos naturais, contaminação e desequilíbrios ambientais, provocados por esse modelo convencional de desenvolvimento, tem contribuído para a adoção de práticas agrícolas tradicionais, associadas aos recursos da ciência moderna, que proporcionem um maior equilíbrio sócio-econômico (ELICHER, 2002) e recuperação da fertilidade dos solos, tais como: rotação e consórcio entre culturas, plantio direto, adubação verde e aporte de nutrientes através de processos biológicos.

A adubação verde consiste na incorporação de massa vegetal, não decomposta, ao solo com a finalidade de preservar e/ou melhorar as terras agricultáveis (CHAVES, 1986). Esta prática agrícola contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BERTONI et al., 1972; MIYASAKA et al., 1983; FAGERIA e BALIGAR, 2005), ciclagem de nutrientes, além da disponibilização de nitrogênio para as plantas, reduzindo assim a poluição ambiental ocasionada pela alta mobilidade do nitrogênio mineral no solo (DUQUE et al., 1985; CREWS e PEOPLES, 2004).

Para uma adequada prática de adubação verde, é necessária a escolha de espécies adaptadas ao tipo de clima, solo e sistema de manejo, uma vez que as condições pedoclimáticas interferem diferentemente sobre o rendimento destas (ALVARENGA, 2003).

Plantas de várias famílias botânicas podem ser utilizadas para essa finalidade. Nota-se porém, maior uso de espécies leguminosas, por serem encontradas em grande diversidade de climas e devido à capacidade de realizarem simbiose com bactérias diazotróficas (KIEHL, 1985), o que representa uma valorosa contribuição para o aporte de nitrogênio.

Neste contexto, espécies do gênero *Crotalaria* são muito utilizadas como adubos verdes, por apresentarem alta produção de massa vegetal e a associação com rizóbios pode suprir total ou parcialmente o teor de nitrogênio necessário ao bom desenvolvimento da cultura de interesse, reduzindo assim o uso de fertilizantes minerais (CASTRO et al., 2005).

Devido ao manejo orgânico e adoção de práticas conservacionistas, que proporcionam acúmulo de matéria orgânica, os solos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA, Fazendinha Agroecológica Km 47, localizada em Seropédica, RJ) apresentam grande diversidade bacteriana, o que aliado ao uso de leguminosas estimula a multiplicação das populações de rizóbios (ZILLI et al., 1998; BRATTI et al., 2005).

A diversidade de rizóbios nativos é de suma importância, sendo uma fonte de recursos genéticos para prospecção e seleção de isolados adaptados às diversas condições. Por outro lado, pode, por meio da competitividade de sítios de nodulação, interferir na ocupação nodular das estirpes inoculadas (MEDEIROS et al., 2009).

O isolamento de bactérias que nodulam plantas utilizadas como adubos verdes, tem colaborado para a taxonomia de rizóbios, uma vez que bactérias ainda não descritas têm sido isoladas de nódulos de diversos adubos verdes. A descrição de espécies novas isoladas de nódulos de adubos verdes tende a aumentar, uma vez que a taxonomia e a ecologia dessas bactérias são ainda pouco estudadas (FERNANDES JÚNIOR, 2009).

A recente revolução na taxonomia de rizóbios, permitindo a identificação de novos grupos e melhor entendimento das relações entre eles, só foi possível mediante ao uso de ferramentas moleculares (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2005; JESUS e MOREIRA, 2008). Porém, a taxonomia microbiana de rizóbios (GRAHAM et al., 1991) aborda uma análise conjunta de dados de morfologia, fisiologia, sorologia e ferramentas baseadas nos ácidos nucléicos (MEDEIROS et al., 2009; TINDALL et al., 2010).

Apesar de serem considerados insuficientes para elucidar as relações filogenéticas dos diferentes grupos de rizóbio (WOESE, 1987), os métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos possuem a vantagem de serem rápidos e baratos, permitindo uma análise prévia da diversidade de microrganismos isolados que poderão ser armazenados e usados posteriormente (SANTOS et al., 2007).

A avaliação das características morfoculturais é o passo inicial na identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos. E como atualmente busca-se uma taxonomia polifásica elas podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados (JESUS et al., 2005; CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

Nesse pressuposto, o presente estudo objetivou isolar, caracterizar por meio de morfologia de colônia e determinar a diversidade fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de três espécies de *Crotalaria*, crescidas em solos de produção orgânica.

Área de estudo

O trabalho foi realizado no município de Seropédica, RJ, numa área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), mantida pela Embrapa (Centros de Agrobiologia e Solos), UFRRJ e PESAGRO (Fig. 1). Na área são cultivadas hortaliças em rotação com *crotalaria* e o solo local é uma transição entre Argissolo amarelo distrófico típico e Latossolo vermelho amarelo distrófico argissólico, de textura média.



Fig. 1. Imagem aérea da área do SIPA e em detalhe o local de implantação do experimento. Fonte: DIAS, 2007.

Amostragem

Raízes de cinco plantas das espécies *Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca* e *C. mucronata* foram coletadas aos 60 dias após o plantio. A partir de cada raiz foram selecionados aleatoriamente dez nódulos para o isolamento e caracterização, perfazendo uma coleção total de 150 isolados.

Isolamento de bactérias de nódulos

Os nódulos coletados 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 isolar 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.

Caracterização dos isolados

Após a purificação dos isolados, foram avaliadas as seguintes características culturais: (1) alteração do pH do meio de cultura (alcalino, ácido e neutro); (2) tempo de crescimento, avaliado pela presença de colônias isoladas (lento: 4 ou mais dias; rápido: até 3 dias); (3) características das colônias (tamanho: mm; forma: puntiforme, circular ou irregular; borda: inteira ou irregular; transparência: opaca, translúcida ou transparente); (4) elevação (plana, lenticular ou convexa); (5) aparência (homogênea ou heterogênea); (6) cor (branca, amarela, branca/amarelada); (7) aderência (à alça de platina quando da remoção do muco da superfície do meio de cultivo) e (8) elasticidade do muco (observada pela formação ou não de fio, no momento da remoção das colônias do meio de cultura), conforme metodologias adaptadas e discriminatórias de grupos morfológicos da rizobiologia (MARTINS et al., 1997; HUNGRIA et al., 2001; FERNANDES JÚNIOR, 2009; MEDEIROS et al., 2009; LIMA, 2009). A caracterização morfocultural completa dos isolados encontra-se na Tab. 1.

Avaliação da coleção

Da coleção inicial de 150 nódulos, foram obtidos 145 isolados, cinco nódulos não apresentaram crescimento em meio. Da coleção de trabalho, 47 estavam associados à *Crotalaria juncea*, 50 à *C. mucronata* e 48 à *C. ochroleuca*. Houve predominância de 85, 94 e 77% dos isolados, respectivamente, em *Crotalaria juncea*, *C. mucronata* e *C. ochroleuca*, que apresentaram crescimento rápido e reação ácida do pH. A forma da colônia mais frequente nos isolados das três espécies foi a circular e o diâmetro destas variou de < 1mm a 5mm. Para as 11 características morfológicas estudadas foi possível observar índice de similaridade de 100% apenas em 19 (40,42%), 26 (52%) e 26 (54,17%) dos isolados em *Crotalaria juncea*, *C. mucronata* e *C. ochroleuca*, respectivamente. Em geral, notou-se uma baixa similaridade entre os isolados das três espécies de Crotalaria e as

estirpes referência. Essa variabilidade morfocultural observada pode indicar a possibilidade de serem microssimbiontes ainda não descritos ou representantes de outras espécies, o que os torna interessantes em estudos de diversidade e seleção de novas estirpes com potencial para inoculação da hospedeira de origem.

A caracterização morfocultural possibilitou um maior conhecimento dos isolados das três espécies de crotalária, permitindo o agrupamento dos mesmos e os parâmetros que mais discriminaram os grupos foram: tempo de crescimento, pH do meio, elevação e transparência das colônias. O agrupamento dos mesmos com base na morfologia de colônia facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de caracterização molecular, de confirmação da nodulação e seleção de bactérias eficientes para a fixação do N_2 nas espécies estudadas.

Os isolados foram armazenados em microtubos contendo meio YMA suplementado com glicerol (15%) e mantidos em superfreezer (-70°C) na Embrapa Agrobiologia. Uma repetição de cada isolado também está sendo mantida em freezer (-20°C) para avaliação da nodulação e eficiência simbiótica em casa de vegetação.

Tabela 1A. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria mucronata*.

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Cm1-1	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cm1-2	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm1-3	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm1-4	rápido	ácido	4mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm1-5	rápido	ácido	3mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm1-6	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm1-7	rápido	alcalino	1mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cm1-8	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm1-9	rápido	alcalino	2mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm1-10	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cm2-1	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm2-2	rápido	alcalino	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm2-3	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cm2-4	rápido	ácido	2mm	circular	plana	irregular	opaca	HO	branco	HO	3	não
Cm2-5	rápido	ácido	2mm	circular	plana	irregular	opaca	HE	branco	HO	1	não
Cm2-6	rápido	ácido	6mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cm2-7	rápido	ácido	4mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm2-8	rápido	ácido	1mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cm2-9	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HE	branco	HO	1	sim
Cm2-10	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm3-1	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm3-2	rápido	ácido	3mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm3-3	rápido	ácido	3mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cm3-4	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cm3-5	rápido	ácido	1mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cm3-6	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cm3-7	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cm3-8	rápido	ácido	3,5mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm3-9	rápido	ácido	3mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm3-10	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Tabela 1A. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria mucronata*. (continuação)

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Cm4-1	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cm4-2	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cm4-3	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cm4-4	rápido	ácido	3mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	2	sim
Cm4-5	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cm4-6	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cm4-7	rápido	ácido	3mm	circular	plana	irregular	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm4-8	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	3	sim
Cm4-9	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm4-10	rápido	ácido	1,5mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm5-1	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm5-2	rápido	ácido	3mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cm5-3	rápido	ácido	< 1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cm5-4	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cm5-5	rápido	ácido	1,5mm	circular	plana	inteira	opaca	HE	amarelo	HO	1	sim
Cm5-6	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	3	sim
Cm5-7	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cm5-8	rápido	ácido	1mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	bran/amar	HO	2	sim
Cm5-9	rápido	ácido	3mm	irregular	lente	irregular	opaca	HE	amarelo	HO	2	sim
Cm5-10	rápido	ácido	2mm	circular	plana	inteira	opaca	HE	amarelo	HO	1	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Tabela 1B. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria juncea*.

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Cj1-1	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj1-2	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	amarelo	HO	1	sim
Cj1-3	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj1-4	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cj1-5	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj1-6	lento	alcalino	< 1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cj1-7	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cj1-8	rápido	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cj1-9	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cj1-10	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	3	sim
Cj2-1	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj2-2	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cj2-3	rápido	ácido	4mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj2-4	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cj2-5	rápido	ácido	4mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj2-6	rápido	ácido	4mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj2-7	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Cj2-8	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	opaca	HE	branco	HO	3	sim
Cj2-9	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	opaca	HE	branco	HO	1	sim
Cj2-10	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj3-1	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	opaca	HE	bran/amar	HO	1	sim
Cj3-2	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj3-3	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj3-4	rápido	ácido	3mm	circular	plana	irregular	opaca	HE	bran/amar	HO	1	sim
Cj3-5	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cj3-6	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj3-7	rápido	ácido	2mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Cj3-8	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj3-9	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj3-10	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Tabela 1B. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria juncea*. (continuação)

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Cj4-1	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Cj4-2	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj4-3	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	3	sim
Cj4-4	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj4-5	rápido	ácido	1mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	3	sim
Cj4-6	lento	alcalino	< 1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cj4-7	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Cj4-8	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	3	sim
Cj5-1	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	3	sim
Cj5-2	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	3	sim
Cj5-3	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj5-4	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj5-5	rápido	ácido	2mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Cj5-6	lento	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Cj5-7	rápido	ácido	2mm	circular	plana	irregular	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj5-8	rápido	ácido	1,5mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Cj5-10	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Tabela 1C. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria ochroleuca*.

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Co1-1	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co1-2	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co1-3	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co1-4	rápido	ácido	4mm	circular	plana	irregular	opaca	HE	bran/amar	HO	2	não
Co1-5	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Co1-6	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co1-7	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co1-8	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Co1-9	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co1-10	rápido	ácido	2mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co2-1	rápido	ácido	5mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co2-2	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Co2-3	rápido	ácido	5mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co2-4	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co2-5	rápido	ácido	4mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	bran/amar	HO	2	sim
Co2-6	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Co2-7	lento	alcalino	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	3	sim
Co2-8	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	1	sim
Co2-9	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co2-10	lento	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co3-1	rápido	ácido	5mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	bran/amar	HO	2	sim
Co3-2	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	bran/amar	HO	2	sim
Co3-3	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	bran/amar	HO	2	sim
Co3-4	rápido	ácido	4mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	3	sim
Co3-5	rápido	ácido	1,5mm	circular	lente	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Co3-6	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co3-7	lento	alcalino	< 1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co3-8	rápido	ácido	3mm	circular	lente	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Tabela 1C. Caracterização morfocultural de isolados obtidos de nódulos de *Crotalaria ochroleuca*. (continuação)

Isolados	Tempo de crescimento	pH do meio	Diâmetro	Forma	Elevação	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Coloração	Aparência do muco	Elasticidade	Aderência
Co4-1	rápido	ácido	1mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co4-2	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co4-3	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co4-4	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co4-5	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co4-6	rápido	ácido	1mm	circular	convexo	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Co4-7	rápido	ácido	< 1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co4-8	lento	alcalino	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co4-9	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co4-10	rápido	ácido	2mm	circular	lente	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co5-1	rápido	ácido	4mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	3	sim
Co5-2	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	2	sim
Co5-3	rápido	ácido	2mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	não
Co5-4	rápido	ácido	3mm	circular	plana	inteira	transl.	HO	branco	HO	2	sim
Co5-5	rápido	ácido	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	2	sim
Co5-6	rápido	ácido	2mm	circular	convexo	inteira	opaca	HO	amarelo	HO	1	sim
Co5-7	rápido	ácido	1,5mm	circular	plana	inteira	opaca	HO	branco	HO	1	sim
Co5-8	rápido	ácido	2mm	circular	plana	irregular	opaca	HE	branco	HO	1	sim
Co5-9	lento	alcalino	1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim
Co5-10	lento	alcalino	< 1mm	circular	plana	inteira	transp.	HO	branco	HO	1	sim

HO: Homogêneo; HE: Heterogêneo.

Referências Bibliográficas

ALVARENGA, R. C. **Adubação verde intercalar como fonte de nutrientes para a cultura do milho orgânico**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003.

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). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005 (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 204).

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

CASTRO, C. M.; ALMEIDA, D. L. de; RIBEIRO, R. de 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.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.

Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHAVES, J. C. D. **Nutrição, adubação e calagem do cafeeiro**. Londrina: IAPAR, 1986. 24p. (IAPAR, Circular, 48).

CHEN, W. M.; FARIA, S. M. de; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, J. F.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

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.

DIAS, J. E. **Monitoramento do uso da terra e dos níveis de nutrientes do solo no sistema integrado de produção agroecológica utilizando geoprocessamento**. 2007. 111f. Tese. (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

ELICHER, M. J. A agroecologia e o desenvolvimento sustentável: uma construção teórica para a análise da agricultura familiar. **Revista de Ciências Humanas**, n. 31, p. 67-91, abril, 2002.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Role of cover crops in improving soil and row crop productivity. **Communications in soil Science and Plant Analysis**, v. 36, p. 2733-2757, 2005.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.]**. 2009. 183 f. Tese. (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; DE LEY, D. J.; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J. P. W. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 582-587, 1991.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.; COCA, R. G.; MEGIAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybeans nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 1349-1361, 2001.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S. Métodos moleculares para o estudo de comunidades de bactérias do solo. In: MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. 768 p.

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

LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de Mucuna**. 2009, 92 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio"**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. (EMBRAPA-CNPAB. Comunicado Técnico, 19).

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

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. 138 p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVINMASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.

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. p. 280-335.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BE ZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de Rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2. n. 4, p. 249-256, dez, 2007.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H.-J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 249-266, 2010.

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

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

ZILLI, J. E.; ALMEIDA, D. L. de; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. **Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em Diferentes Áreas de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 15 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69).



Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**