

# COLETA DE AMOSTRAS DE SOLOS E ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE *Rhizobium* sp., PARA O ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

**Willian Bucker Moraes<sup>1</sup>, Leonardo Nazário S. do Santos<sup>2</sup>, Regina G. S. Oliveira<sup>3</sup>,  
Sebastião Martins Filho<sup>4</sup>, Gustavo Dias de Almeida<sup>5</sup>, Juliano Gonçalves dos  
Santos<sup>6</sup>, Moises Zucoloto<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Fed. do Espírito Santo, C.P.16, 29500-000 Alegre - ES,  
<sup>1</sup>moraeswb@hotmail.com, <sup>2</sup>nazariooss@hotmail.com, <sup>3</sup>regina-ms@cca.ufes.br, <sup>4</sup>smartins@dpi.ufv.br,  
<sup>5</sup>gustavokbe@hotmail.com, <sup>6</sup>juliano\_agronomia@hotmail.com, <sup>7</sup>moiseszucoloto@hotmail.com

**Resumo** - Os solos brasileiros são deficientes em nitrogênio (N<sub>2</sub>), a associação do feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium*, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à cultura, é uma tecnologia capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada. Para isso foram coletadas amostras de solos dos municípios de Colatina, Vila Pavão, Nova Venécia, Pinheiros, Sooretama, Linhares e Alegre, sendo regiões produtoras de feijão há vários anos, no estado do Espírito Santo. Com intuito de isolar populações nativas de bactérias do gênero *Rhizobium*, a fim de se obter colônias puras, isoladas e de crescimento homogêneo, podendo considerar cepas livres de contaminantes.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*, Melhoramento Genético, Estabilidade, Adaptabilidade.

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias

## Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura amplamente difundida no mundo todo, sendo que no Brasil é cultivada uma área de aproximadamente 5,5 milhões de hectares (ha), contribuindo com aproximadamente 28% do consumo de proteínas da população (HUNGRIA et al., 2000), sendo que o país é o segundo maior produtor mundial, embora com baixos níveis de produtividade média, uma vez que grande parte da produção está ligada principalmente à agricultura familiar.

Uma vez que os solos brasileiros são deficientes em N<sub>2</sub>, a fixação do N<sub>2</sub> pelas bactérias *Rhizobium* poderia aumentar a produtividade da cultura de feijão, com baixos custos e preservar as fontes de água, pois evitaria a poluição por fertilizantes, como o nitrato (HUNGRIA et al., 1997).

Segundo Mercante et al. (1992) relataram que a falta de resposta do feijoeiro à inoculação é, muitas vezes, devido à presença de rizóbios nativos no solo, que nodulam o feijoeiro mesmo em áreas onde a cultura está sendo implantada pela primeira vez, sabendo-se que não existe nenhuma informação disponível sobre as características das populações nativas de *Rhizobium* nos solos do Estado do Espírito Santo. Torna-se necessário isolar populações nativas de bactérias do gênero *Rhizobium*, a fim de se obter colônias puras, isoladas e de crescimento homogêneo, podendo considerar cepas livres de contaminantes para eventuais estudos sobre fixação biológica e produtividade do feijoeiro.

## Materiais e Métodos

Foram coletadas as amostras de solo dos municípios de Colatina, Vila Pavão, Nova Venécia, Pinheiros, Sooretama, Linhares e Alegre, onde houve cultivo de feijão por vários anos, foram coletadas e diluídas conforme descrito por Amarger & Hamakawa (1997), isolando populações nativas de bactérias do gênero *Rhizobium*. Parte desta diluição foi utilizada para inoculação de plântulas de feijão do cultivar Capixaba Precoce, considerada boa planta hospedeira fixadora de N<sub>2</sub> (HUNGRIA & NEVES, 1987; SILVA et al., 1999) e plântulas do genótipo BATT-477 considerados tolerantes a seca.

Sementes destes genótipos foram previamente desinfetadas por imersão em etanol 70% e em hipoclorito de sódio 4%, seguindo-se de cinco lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970; HUNGRIA & ARAÚJO, 1994), e colocadas para germinar em rolos de papel germitest, mantidos sempre úmidos. Três dias após a emergência da radícula, as plântulas foram inoculadas com uma solução de solo, preparada com 1,0 g de solo de cada local coletado, dissolvido em 10 mL de água destilada, sendo imediatamente transferidas para vasos de Leonard modificados e mantidos em casa de vegetação. Após 40 dias da emergência das plântulas, os nódulos foram coletados, desinfetados, macerados e semeados em placas de Petri contendo meio de cultura com extrato de levedura-manitol-ágar em pH 6,8 (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994).

Após a primeira semeadura foram feitos novos plaqueamentos, utilizando-se a técnica de esgotamento de alça, a fim de se obter colônias puras, isoladas e de crescimento homogêneo, que se pode considerar uma cepa livre de contaminantes (VINCENT, 1970; HUNGRIA & ARAÚJO, 1994; MELO & AZEVEDO, 1998).

## Resultados

Após 40 dias da emergência das plântulas (Figura 1a), os nódulos (Figura 1b) foram coletados, desinfetados, macerados e semeados em placas de Petri, para realizar novos plaqueamentos, utilizando-se a técnica de esgotamento de alça, obtendo colônias puras, isoladas e de crescimento homogêneo, as quais podem ser consideradas cepas livres de contaminantes (Figura 2).

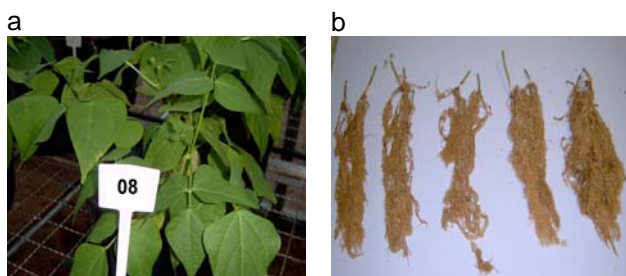


Figura 1. a) Plantas de feijoeiro do cultivar Capixaba Precoce utilizado e, b) raízes exibindo os nódulos das bactérias nativas fixadoras de nitrogênio. Alegre, 2006.



Figura 2. Colônias puras de bactérias nativas fixadoras de nitrogênio, isoladas e de crescimento homogêneo livre de contaminantes. Alegre, 2006.

## Discussão

O isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio foi realizada com sucesso, seguindo os critérios descritos segundo Vincent, 1970; Hungria & Araújo, 1994; Melo & Azevedo, 1998, mostrando um bom crescimento de todas as estirpes (Figura 2), sendo estas de fácil reprodução em meio de cultura com extrato de levedura-manitol-agar em pH 6,8 (Hungria & Araújo, 1994).

## Conclusão

Devido suas características de fácil desenvolvimento, pode ser de fácil custeio a sua produção em larga escala, como inoculante, para atender aos agricultores futuramente, reduzindo custos, aumentando a produtividade, além de preservar as fontes de água, pois a fixação biológica de nitrogênio evita a poluição por fertilizantes nitrogenados. Sendo a chave para um manejo sustentável dos solos.

## Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto; e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica de WBM e LNSS. Eo Prof. Dr. Sebastião Martins Filho pela orientação e oportunidade de ingresso na iniciação científica.

## Referências

-AMARGER, D. S., HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M., ARAÚJO, R.S. (Eds.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA-SPI, Brasília, Brasil. 1997, pp.63-94.

-HUNGRIA, M. ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.A. O., PROBENZA, A., GUTTIERREZ-MANERO, F.J., MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient na competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.

-HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., COLOZZI-FILHO, A., BALOTA, E.L. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura e consorcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.807-818, 1997.

-HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA. 1994.

-HUNGRIA, M., NEVES, M.C.P. Cultivar and Rhizobium strain effects on nitrogen fixation and

transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.103, p.111-121, 1987.

-MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. Brasília: EMBRAPA/CNPMA, 1998. 488p.

-MERCANTE F.M.; FRANCO, A. A.; MUNNS, D. N. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. Seropédica: Embrapa-CNPAP, 1992. (Comunicado Técnico, 10).

-SILVA, D. M., COSTA, A., N., LIMA, P. F, ANDRADE, M. C. F. E. O sistema simbiótico *Phaseolus vulgaris-Rhizobium leguminosarum* em ambiente com disponibilidades distintas de fósforo. In: Reunião Nacional de Pesquisa do feijão, 4., 1999. EMBRAPA/EBDA, 1999. v.1, p.98-99.

-VINCENT, J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IPB HANDBOOK n° 15, London:Blackwell Scientific Publ., 1970. 164p.