



# OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS SIMBIÓTICOS FIXADORES DE NITROGÊNIO EM SOLOS CULTIVADOS E SOB FLORESTA

Saturno, D.F.<sup>1,2</sup>;

Novaes, A.G.<sup>3</sup>; Lima Filho, A.<sup>3</sup>; Dorigo, O.F.<sup>4</sup>; Andrade, D.S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduando em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina - UEL; <sup>2</sup>Bolsista de Iniciação Científica, PiBIC - Fundação Araucária; <sup>3</sup>Graduando em Ciências Biológicas - UNIFIL; <sup>4</sup>Pesquisadora, Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR - Laboratório de Microbiologia de solos Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375, Três Marcos, 86047 - 902, Caixa Postal 481, Londrina, Paraná, Brasil. [diogosaturno@gmail.com](mailto:diogosaturno@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. Nesse sentido, o empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora e minerais). Entretanto, como no passado essa não foi a base da agricultura existe uma alta predominância de áreas degradadas.

Dada a magnitude das ações que devem ser realizadas para a restauração de ecossistemas florestais degradados, principalmente, ao longo dos cursos de águas, as matas ciliares e outras áreas destinadas à preservação permanente (RODRIGUES e GANDOLFI, 2004), a seleção de espécies de caráter mais rústico assume grande importância, não só para garantir a sobrevivência no campo, mas também para propiciar o ambiente adequado ao surgimento de outras espécies, a fim de facilitar a sucessão vegetal e reverter o processo de degradação.

As leguminosas da família Fabaceae despertam interesse para o múltiplo uso já que, em sua maioria, são lenhosas e perenes, se adaptam aos mais diversos ecossistemas brasileiros e, ainda apresentam a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em associação com bactérias comumente chamadas de rizóbio (SPRENT, 1995). A introdução de plantas nativas em associação com comunidades manejadas de microsimbiontes, como bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, constituem uma promissora ferramenta biotecnológica para auxiliar no repovoamento de ecossistemas desertificados ou em processo de desertificação/degradação (FRANCO e FARIA 1997; REQUENA *et al.*, 001).

A família leguminosae compreende em torno de 20.000 espécies, no território brasileiro são encontrados aproximadamente 2.500 destas espécies, sendo a maioria de porte

arbóreo ou arbustivo.

Espécies vegetais produtoras de grãos, como o feijoeiro e o amendoizeiro, destacam - se quanto ao seu potencial para formar simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico. Deste modo, pode - se dispensar total ou parcialmente a adubação nitrogenada e ainda contribuir para outras espécies em sucessão, garantindo a auto - sustentabilidade do agroecossistema com relação ao nitrogênio disponível no solo.

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão com a safra de 2007/2008 estimada em 3,5 milhões de toneladas, o que equivale a 16% da produção mundial de feijão. Apesar dessa estimativa, a produtividade brasileira de feijão ainda é relativamente baixa e, uma alternativa para aumentar a produção a um baixo custo é através da fixação biológica de nitrogênio(FBN).

Outra importante leguminosa é o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), além de importante fonte nutritiva para o homem, estabelece uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, o que é de fundamental importância, visto que estas ajudam a repor o nitrogênio necessário ao desenvolvimento vegetal (PORTES, 1996).

A Mimosa scabrella Bentham, conhecida popularmente como bracatinga, é uma importante fonte de matéria - prima energética e para recuperação de áreas degradadas, é uma espécie característica do planalto sul - brasileiro exclusiva da vegetação secundária da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), nas formações Montana e Alto - Montana. A árvore é bastante ornamental, principalmente quando há presença de flores, pode ser empregada, com sucesso, no paisagismo (LORENZI, 1992).

Por ter uma elevada taxa de crescimento, considerada uma das mais rápidas entre as árvores brasileiras, é atualmente, a espécie florestal nativa mais importante da região metropolitana de Curitiba, (BAGGIO, 1994). As sementes desta espécie são encontradas no banco de sementes do solo, onde

forma banco de sementes permanente (CARNEIRO *et al.*, 1982; CARPANEZZI *et al.*, 1997).

Como espécie facilitadora, a bracatinga, por regeneração natural ou sendo plantada, recobre rapidamente terrenos queimados, inibindo a vegetação herbácea - arbustiva e criando condições de micro clima favoráveis para espécies tolerantes ao sombreamento (CARPANEZZI, 1997).

O reflorestamento com bracatinga é eficiente para a recuperação do solo por microorganismos e vegetação autóctones, que constituem elos importantes de cadeias biológicas (ROTH, 1982). A espécie é recomendada para reposição de mata ciliar em locais com ausência de inundação e encharcamento.

As espécies arbóreas leguminosas apresentam grande potencial de rápido crescimento, sendo de grande importância na recuperação de solos degradados através da cobertura vegetal. As árvores em alguns meses recobrem o solo e minimizam o efeito do intemperismo. Além disso, depositam elevadas quantidades de folhedo rico em matéria orgânica e nutriente, melhorando a fertilidade do solo. A utilização principalmente das espécies florestais nativas dentro de critérios ecológicos bem definidos poderá devolver à região suas características paisagísticas e os principais recursos florestais.

## OBJETIVOS

Verificar a ocorrência e distribuição de microrganismos fixadores de nitrogênio em plantas leguminosas em solos cultivados e sob floresta de 36 municípios do estado do Paraná. Um segundo objetivo é formar um banco de estirpes de rizóbios com alta capacidade de fixação de nitrogênio para produção de mudas de espécies florestais nativas para uso na recuperação de áreas degradadas e reflorestamentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O feijoeiro, forma simbiose com um grande número de espécies de *Rhizobium* que, também, nodulam espécies leguminosas arbóreas, por ex., *R. tropici*, e o amendoineiro que nodula efetivamente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, foram escolhidos pois, suas estirpes poderão ser utilizadas em leguminosas arbóreas. A bracatinga está sendo estudada por ter uma elevada taxa de crescimento, considerada uma das mais rápidas entre as árvores brasileiras.

Os parâmetros avaliados foram: presença ou ausência de nódulos, eficiência dos nódulos, coloração da parte aérea, peso da raiz úmida e peso da massa seca das folhas. A coleta ocorreu pós 40 dias de desenvolvimento em casa de vegetação.

O experimento está sendo conduzido em casa de vegetação, no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em vasos contendo as amostras de solos de profundidade (0 - 10cm) coletadas em 36 municípios do estado do Paraná, divididos em 8 regiões (Norte, Sul, Noroeste, Oeste, Sudoeste, Centro, Metropolitana e Litoral) a fim de se obter uma maior diversidade de solos e consequentemente uma maior diversidade de microrganismos, as localidades são, (Guaraqueçaba, São José dos Pinhais, Ponta Grossa, Morretes, Telemaco Borba,

Cascavel, Guaíra, Palotina, Quedas do Iguaçu, Francisco Beltrão, Candido Abreu, Palmas,

Pato Branco, Apucarana, Guarapuava, São Miguel do Iguaçu, Santa Helena, Campo Mourão,

Cianorte, Umuarama, Ibiporã, Londrina, Paranavaí, Bela Vista do Paraíso, Cambará, Bandeirantes,

Joaquim Távora, Lapa, Irati, Cerro Azul, Jaguaraíva, Laranjeiras do Sul, Diamante Norte, Planalto,

Nova Canto e Mauá da Serra), todas com pontos georreferenciados próximos as estações agrometeorológicas do Instituto Agrônomo do Paraná

(IAPAR) e Instituto Tecnológico SIMEPAR.

Os vasos foram montados com volumes de 200, 300 e 500 mL, foram plantados feijão (*Phaseolus vulgaris* L), amendoim (*Arachis hypogaea* L) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth), respectivamente, os vasos contêm somente os solos sem adição alguma de nutrientes para verificar a ocorrência de microrganismos fixadores de nitrogênio capazes de nodular essas plantas hospedeiras.

As sementes da bracatinga foram obtidas do banco de germoplasma de espécies florestais do IAPAR. A dormência de suas sementes foi quebrada em água a 80 °C e resfriamento natural por um período de 5 horas. As sementes de feijão e amendoim foram desinfestadas em álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 3% depois lavadas em água esterilizada, foram plantados 2 sementes em cada vaso, com 3 repetições para cada amostra de solo.

No florescimento as plantas foram coletadas, para pesagem de suas partes aéreas e raízes, e verificar a presença ou ausência de nódulos em suas raízes. Das plantas que apresentaram nódulos foi realizado isolamento das bactérias para se obter um banco de microrganismos para estudos da diversidade e da eficiência simbiótica para produção de inoculantes, a fim de se obter uma eficiente produção de mudas florestais.

O isolamento e purificação das bactérias foram feitos em condições controladas de laboratório utilizando capelas de fluxo laminar. Inicialmente os nódulos foram reidratados em água esterilizada, tratados por 30 segundos com álcool etílico, em seguida com hipoclorito de sódio a 6% e, em água esterilizada. Com uma pinça, aproveitando a última água de lavagem, cada nódulo é macerado, a suspensão que fica na ponta da pinça, após o maceramento, é riscada em placa contendo meio de cultura extrato de levedura com manitol. Após 3 a 11 dias de incubação a 30°C, usando uma alça de platina, a massa de bactérias formadas sobre o meio é novamente riscada no mesmo meio de cultura para obtenção de colônias isoladas.

Cada cultura que irá constituir uma estirpe deve ser proveniente de uma colônia isolada da bactéria. Depois de isoladas, as estirpes de rizóbio foram autenticadas (foram inoculadas para avaliar o efeito das bactérias no estabelecimento e no crescimento inicial de leguminosas arbóreas nativas) e conservadas em glicerol e estocadas em ultra - freezer a -80°C e liofilizadas.

## RESULTADOS

De 153 amostras avaliadas de feijoeiro, 86% apresentaram nódulos em suas raízes. Em 88% das áreas cultivadas com (mandioca, milho, pupunha e soja) apresentaram nódulos nas raízes e áreas sob floresta 83% apresentou nódulos, sendo que do total avaliado de de 86% de raízes noduladas, 90% apresentou nódulos eficientes, demonstrando coloração interna avermelhada indicando a presença da leghemoglobinas (legHb) sintetizadas nos nódulos de raiz de plantas leguminosas durante a fixação simbiótica de N<sub>2</sub>. Quanto a coloração da parte aérea de suas folhas 80% apresentaram coloração verde e 20% coloração amarelada, um parâmetro que pode evidenciar falta de nutrientes entre eles o nitrogênio. O peso úmido das raízes obteve a média de (0,96 - 2,45 gramas) e sua massa seca variou de (0,25 - 0,68 gramas).

Do amendoineiro obteve - se um total de 192 amostras avaliadas, sendo que 84% apresentaram nódulos em suas raízes. Em áreas cultivadas com (mandioca, milho, pupunha e soja) 95% apresentaram nódulos nas suas raízes, e 74% apresentou nódulos em áreas sob floresta. De 84% de raízes com presença de nódulos, obteve - se um total de 80% de nódulos eficientes com a presença da leghemoglobinas (legHb). A coloração da parte aérea das folhas do amendoim, 90% apresentaram suas folhas verdes e 10% amareladas, resultados que evidenciam uma propriedade do amendoineiro, que não responde aos compostos nitrogenados, e muitas vezes utiliza o nitrogênio do próprio solo para o seu desenvolvimento. O peso úmido das raízes obteve a média de (1,05 - 2,87 gramas) e sua massa seca variou de (0,35 - 0,87 gramas).

Os resultados das análises, demonstraram que a bactéria capaz de se associar ao feijoeiro e o amendoineiro tem uma ocorrência generalizada. O feijoeiro da área cultivada com soja (Palotina), área cultivada com milho (Santa Helena) e área sob floresta (Laranjeiras do Sul) não apresentou nódulos em suas raízes. O amendoineiro da área cultivada com soja (Francisco Beltrão), e áreas sob florestas (Pato Branco, Guarapuava e Laranjeiras do Sul) teve ausência de nódulos em suas raízes. A bracinga está em desenvolvimento. Das plantas que ocorreram nodulação foram realizados isolamentos para formar um banco de estirpes de rizóbios para leguminosas e para estudos da diversidade e da eficiência simbiótica para produção de inoculantes visando a produção de mudas de espécies florestais nativas da região Sul.

A utilização de leguminosas fixadoras de N<sub>2</sub> em processos de recuperação de áreas degradadas e reflorestamentos podem promover a melhoria dos indicadores de qualidade do solo por meio do aumento dos níveis de matéria orgânica e N, aumentarão a biodiversidade da área e a ciclagem de nutrientes sendo uma alternativa promissora ao manejo de áreas com baixa fertilidade. A combinação desses processos poderá se reverter em preservação ao meio ambiente e, conseqüentemente ganhos de produtividade (THRALL, *et al.*, 005).

Contudo, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação do N<sub>2</sub> no campo, em decorrência, dentre outros fatores, da competição com a população nativa e estabelecida do solo e da baixa adaptação às condições ambientais locais. Assim, a seleção de novas estirpes em simbiose com leguminosas é

uma ferramenta importante na busca de um par simbiótico mais eficiente (THRALL, *et al.*, 005).

## CONCLUSÃO

Na maioria dos solos do Paraná constatou - se a presença de rizóbios que formam nódulos no feijoeiro e amendoineiro. A nodulação do feijoeiro não apresentou diferenças em solos de áreas cultivadas e sob floresta.

A nodulação no amendoineiro foi maior nos solos de áreas cultivadas.

Os isolamentos realizados formaram o banco de estirpes para estudos de eficiência e diversidade.

As estirpes eficientes podem ser utilizadas na inoculação de leguminosas arbóreas para produção de mudas com eficiência para os processos de recuperação de áreas degradadas e reflorestamentos.

Agradecimentos ao PiBIC/Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa e ao IAPAR pela estrutura concedida.

## REFERÊNCIAS

- Baggio, A. J. **Estudio sobre el sistema agroforestal tradicional de la bracinga (Mimosa scabrella Benth.) en Brasil: productividad, manejo de residuos y elaboracion de compost.** 1994. 242 f. Tese (Doutorado) - Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1994.
- Campello, E. F. C. **Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas.** In: Dias, L. E.; Mello, J. W. V. de (Ed.). *Recuperação de áreas degradadas.* Viçosa: UFV, 1998. p. 183 - 194.
- Carpanezzi, A. A.; Pagano, S. N.; BAGGIO, A. J. Banco de sementes de bracinga em povoamentos do sistema agroforestal tradicional de cultivo. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 35, p. 3 - 19, 1997.
- Franco, A. A.; Faria, S. M. The contribution of N<sub>2</sub> - fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897 - 903, 1997.
- Gaiad, S.; Carpanezzi, A. A. Ocorrência de Rhizobium em leguminosas de interesse silvicultural para a Região Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 156 - 158, 1984.
- Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. (Eds). **Microbiologia e Bioquímica do solo.** Universidade Federal de Lavras, 625 pp, 2002.
- Portes, T. de A. **Produção de feijão nos sistemas consorciados.** Goiânia: EMBRAPA - CNPAF, 1996, 50p. Documentos, 71
- Reis, A.; Nakazono, E.M.; Matos, J. Z. Utilização da sucessão e das interações planta - animal na recuperação de áreas florestais degradadas. In: **Recuperação de Áreas**

Degradadas, 3. Curso de Atualização. Curitiba: 1996, p. 29 - 43.

Requena, N.; Perez - Solis, E.; Azcón - Aguilar, C.; Jeffries, P.; Baries, J.M. Management of indigenous plantmicrobe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.2, p.495 - 498, 2001.

Rodrigues, R.R.; Gandolfi, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R.R.; Leitão - Filho, H.F. (Ed.) **Matas ciliares: conservação e recuperação**. 3.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo / Fapesp, 2004. p.235 - 247.

Roth, P. S. **O efeito do fogo sobre a quebra de dormência em sementes de bracatinga (Mimosa bracinga Hoehne)**. Piracicaba: IPEF, 1982. 7p. (IPEF. Circular técnica, 143).

Sprent, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.4/5, p.401 - 407, 1995.

Thrall, P.H.; Millson, D.A.; Jeavons, A.C.; Waayers, M.; Harvey, G.R.; Bagnall, D.J.; Brockwell, J. Seed inoculation with effective root - nodule bacteria enhances revegetation success. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.42, p.740 - 751, 2005.