



**Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Instituto de Florestas  
Curso de Graduação em Engenharia Florestal**

**Seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas**

**Keila Caroline Dalle Laste**

**Seropédica, RJ  
Dezembro, 2008**

# **Seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas**

**Keila Caroline Dalle Laste**

*Sob orientação do pesquisador*  
**Sergio Miana de Faria**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

**Seropédica, RJ**  
**Dezembro, 2008**

**Seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio  
para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas**

**Keila Caroline Dalle Laste**

Aprovada em 04 /12 / 2008

---

Sergio Miana de Faria  
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia  
(orientador)

---

Eliane Ribeiro da Silva  
Pesquisadora-Embrapa Agrobiologia

---

Gustavo Ribeiro Xavier  
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia

*Para minha mãe Anadir (in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meu pai Eugênio, minhas irmãs Cátia e Cassiele e minha madrinha Angelina por todo o amor.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela educação gratuita e de qualidade.

À Embrapa Agrobiologia pelo suporte na execução dos trabalhos.

À Companhia Vale e à Fapur pelo financiamento do projeto.

Ao pesquisador Sergio Miana de Faria pela oportunidade de iniciação científica.

Aos pesquisadores do Laboratório de Leguminosas Cláudia Pozzi Jantalia e Alexander Silva de Resende pela ajuda nas correções dos trabalhos e ao querido e saudoso Paulinho por todo o carinho.

Aos componentes da banca examinadora pelo tempo e atenção disponibilizados.

A Abdala Diedhiou, pela ajuda e conselhos na etapa final.

Aos técnicos do laboratório de Leguminosas da Embrapa Agrobiologia: Telmo Félix da Silva, Carlos Fernando da Cunha e Adriana Santos Nascimento pelo auxílio e o bom humor contagiante.

Aos funcionários da casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia: Naldo, Claudinho, Luizinho e Serginho por toda ajuda e boa vontade sempre!

Aos estagiários do laboratório de Leguminosas pelo sofrimento dividido e risadas multiplicadas, em especial a Fernando Soares Gonçalves, Elizabeth Silva Uchôas, Wardsson Lustrino Borges, Anatoly Torres e Pedro Medrado Krainovic.

À minha família ruralina pelos inesquecíveis momentos vividos: Tattiane G. Costa, Deivid L. Machado, Samoel S. Monteiro, Luany L. da Silva, Anderson R. Diniz, Gabryella M. Pereira, Caroline Pinheiro, Lívia Cabral e Andréia Afonso, pra sempre no coração!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E enfim, a Ele que nunca me abandona.

Muito obrigada.

*“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”*

Louis Pasteur

## RESUMO

Leguminosas florestais são conhecidas pelo importante papel que desempenham na recuperação de áreas degradadas, e por essa propriedade algumas espécies são utilizadas na revegetação de áreas mineradas. Muitas leguminosas se associam com bactérias fixadoras de nitrogênio, promovendo o crescimento. O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência e a eficácia de diferentes bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com quatro leguminosas (*Desmodium leiocarpum*, *Tephrosia adunca*, *Mimosa xanthocentra* e *Mimosa somnians*) em dois substratos (areia e vermiculita esterilizados e em solo não esterilizado) e verificar o efeito da adição de três diferentes formas de nitrogênio mineral no crescimento dessas espécies. Estirpes de bactérias foram testadas em comparação com controle nitrogenado e controle absoluto (planta sem N) em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, Seropédica RJ. Foram obtidas diferentes respostas da planta em relação à bactéria inoculada. As duas melhores estirpes de bactérias para o desenvolvimento da planta em substrato esterilizado são BR 2216 e BR 6610 para *D. leiocarpum*, BR 5303 e BR 3628 para *T. adunca*, e BR 3523 e BR 3454 para *M. xanthocentra*. E em solo não esterilizado os melhores resultados obtidos foram BR 3467e BR 4406 para *D. leiocarpum*, BR 5609 e BR 96 para *T. adunca*, e BR 3477e BR 3474 para *M. somnians*. Os resultados mostram que a resposta da planta à inoculação depende da bactéria e do substrato utilizado, e para o sucesso da recuperação torna-se necessário selecionar uma boa parceria (planta e bactéria).

**Palavras-chave:** simbiose, eficácia, crescimento

## ABSTRACT

Legume trees are known to play important roles in recovery of degraded areas, thus some species have been used in substrate reconstitutions and restoration of mined areas. Most of these legumes are associated with nitrogen fixing bacteria (NFB) which may improve their growth. The aim of this work was to evaluate the efficiency and effectiveness of different NFB in association with four legumes (*Desmodium leiocarpum*, *Tephrosia adunca*, *Mimosa xanthocentra* and *Mimosa somnians*) in two substrates (sterilized mixture of vermiculite and sand, and non sterilized soil). Fifty-four bacterial strains were tested in comparison with supply of nitrogen sources to plants, and control treatment (plant without nitrogen supply) in a greenhouse at Embrapa Agrobiologia, Seropédica RJ. Contrasting responses of plants to bacterial inoculations were obtained. The two best bacterial strains for plant benefit in the sterilized substrate were BR 2216 and BR 6610 for *D. leiocarpum*, BR 5303 and BR 3628 for *T. adunca*, and BR 3523 and BR 3454 for *M. xanthocentra*. While in the non sterilized soil the best performances were obtained with BR 3467 and BR 4406 for *D. leiocarpum*, BR 5609 and BR 96 for *T. adunca*, and BR 3477 and BR 3474 for *M. somnians*. Our results clearly showed that the response of tree species to inoculation depends on associated bacterial strains and growing substrate, and therefore raised the question of selection of good partners (plant and bacteria) for land reclamation.

**Key words:** symbiosis, efficacy, growth



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	1
2.1 A atividade de mineração	1
2.2 Recuperação de áreas degradadas	2
2.3 As leguminosas	2
2.4 O nitrogênio	3
2.5 A simbiose planta-bactéria	3
2.6 A metodologia de seleção de estirpes	4
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	4
<b>3.1 Experimento em condições estéreis</b>	4
3.1.1 Montagem do experimento	4
3.1.2 Sementes	8
3.1.3 Inoculação	8
3.2 Condução do experimento	9
<b>3.2 Experimento em condições não estéreis</b>	10
3.2.1 Montagem do experimento	10
3.2.2 Sementes	10
3.2.3 Inoculação	10
3.3.5 Condução do experimento	10
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	10
<b>4.1 Experimento em condições estéreis</b>	10
4.1.1 <i>Desmodium leiocarpum</i>	10
4.1.2 <i>Tephrosia adunca</i>	13
4.1.3 <i>Mimosa xanthocentra</i>	15
<b>4.2 Experimento em condições não estéreis</b>	16
4.2.1 <i>Desmodium leiocarpum</i>	16
4.1.2 <i>Tephrosia adunca</i>	17
4.1.3 <i>Mimosa somnians</i>	18
<b>5. CONCLUSÃO</b>	19
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	20
<b>7. ANEXO A</b>	23

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Casa de vegetação, Embrapa Agrobiologia.....	8
<b>Figura 2.</b> Bactérias crescidas em meio 79 sólido e semi-sólido.....	9
<b>Figura 3.</b> Comparação entre o melhor tratamento, testemunha nitrogenada e testemunha absoluta em <i>D. leiocarpum</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Desenvolvimento do sistema radicular de <i>T. adunca</i> frente três tratamentos.....	13
<b>Figura 5.</b> Competitividade das estirpes inoculadas que proporcionaram bom desenvolvimento em <i>D. leiocarpum</i> , em substrato não esterilizado.....	17
<b>Figura 6.</b> Tratamento inoculado, testemunha nitrogenada e testemunha absoluta de <i>T. adunca</i> em vaso de solo não estéril.....	19

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Listagem das estirpes utilizadas nos experimentos, os hospedeiros da qual foram coletados os nódulos e sua origem.....	5
<b>Tabela 2.</b> Acúmulo de massa da parte aérea seca e de nódulos, eficiência e eficácia dos tratamentos para <i>D. leiocarpum</i> , coletado aos 104 dias após o plantio.....	12
<b>Tabela 3.</b> Acúmulo de massa da parte aérea seca e de nódulos, eficiência e eficácia dos tratamentos para <i>T. adunca</i> .....	14
<b>Tabela 4.</b> Massa da parte aérea seca e dos nódulos secos, eficiência e eficácia das estirpes que proporcionaram nodulação em <i>M. xanthocentra</i> .....	15
<b>Tabela 5.</b> Acúmulo de massa da parte aérea seca, nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para <i>D. leiocarpum</i> , em vaso com solo.....	16
.	.
<b>Tabela 6.</b> Massa da parte aérea seca, nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para <i>T. adunca</i> , cultivada em vaso com solo.....	18
.	.
<b>Tabela 7.</b> Acúmulo de massa da parte aérea seca, nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para <i>M. somnians</i> .....	19

## 1. INTRODUÇÃO

O despertar da sociedade com as questões ambientais vem trazendo mudanças de comportamento e busca de soluções que atenuem as agressões, bem como recuperem o ambiente agredido. O panorama atual busca mecanismos que permitam alcançar o desenvolvimento econômico aliado à conservação da natureza.

Entre os recursos 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 perdem 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 et al., 2003). Neste sentido, a implantação de leguminosas florestais associadas a microrganismos é uma alternativa para minimizar 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 planta, bactéria diazotróficas e fungos micorrízicos, adquirem a capacidade de incorporar C e N ao solo, sendo mais eficientes na absorção de nutrientes, tornando as plantas mais tolerantes aos estresses ambientais (FRANCO & BALIERO, 2000).

A capacidade de se associar com bactérias que formam nódulos e fixam N não é uma característica comum a todas as leguminosas. A nodulação tem sido relatada na maioria das espécies da sub-famílias Mimosoideae e Papilionoideae, sendo que na subfamília Caesalpinioideae, é menos expressiva (FARIA & GUEDES, 1999; BARBERI et al, 1998; SPRENT, 2001).

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 florestais 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.

Este trabalho teve como objetivo selecionar estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para *Desmodium leiocarpum* Spreng. *G Don*, *Tephrosia adunca* Benth., *Mimosa xanthocentra* Mart. e *Mimosa somnians* Willd. e estudar o efeito da adição de três diferentes formas de nitrogênio mineral no crescimento dessas espécies.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A atividade de mineração

Dentre os diversos fatores de degradação no mundo, o superpastejo é responsável por 34,5 % das áreas degradadas, o desmatamento por 29,4 %, as atividades agrícolas por 28,1 %, a exploração intensa da vegetação para fins domésticos por 6,8 % e as atividades industriais e bioindustriais (incluindo as atividades de mineração e empréstimo) por 1,2% (OLDEMAN, 1994).

A mineração está entre as principais atividades econômicas no Brasil. De acordo com o SUMÁRIO MINERAL (2008), em 2007, o país ocupou a 3º posição na produção mundial de

bauxita, contribuindo com 12,7% do total produzido mundialmente e de minério de ferro com 18,8%.

A mineração pode ser considerada uma das atividades mais impactantes ao solo, mas de forma geral não afeta grandes extensões territoriais. A extração de minérios caracteriza-se pela rigidez locacional do depósito mineral (uma jazida encontra-se onde os condicionantes geológicos a criaram) e não se podem extrair minérios sem modificar o ambiente (HERRMANN, 2007)

Algumas conseqüências deletérias para o ambiente quando as atividades de mineração não são bem conduzidas são citadas por HERRMANN et al. (1987), tais como: erosão, impactos entre a fauna e a flora, poluição da água, do ar, solo, sonora e visual, alteração do lençol freático entre outras.

A mineração, na sua maioria, envolve uma intensa movimentação e retirada das camadas superficiais e sub-superficiais de solo, retirada da vegetação e geração de rejeitos e outros substratos (estéril) de difícil colonização (REISSMANN, 1996). A intensidade da degradação depende do volume, do tipo de mineração e dos rejeitos produzidos (REIS, 2006).

## **2.2. Recuperação das áreas degradadas**

A recuperação de áreas degradadas visa fornecer as condições para que o ecossistema possa restabelecer suas funções iniciais mínimas e assim restaurar um novo equilíbrio do solo e sua paisagem (DIAS & GRIFFITH, 1988).

A recuperação de áreas degradadas por mineração é regida pela Constituição Federal de 1988, artigo 225, onde estabelece que: "aquele que explorar recursos minerais fica obrigado a recuperar o meio ambiente degradado, de acordo com solução técnica exigida pelo órgão público competente, na forma de lei". O Decreto Nº 97.632 de 10 de abril de 1989 estabelece a finalidade do Plano de recuperação de área degradada (PRAD) pela mineração onde: "A recuperação deverá ter por objetivo o retorno do sítio degradado a uma forma de utilização, de acordo com um plano preestabelecido para o uso do solo, visando à obtenção de uma estabilidade do meio ambiente".

A recuperação do ambiente é um processo difícil na medida em que estas áreas praticamente não possuem nutrientes essenciais ao crescimento das plantas, além de possuírem características físicas que dificultam o crescimento de raízes e o estabelecimento de plantas espontâneas.

De acordo com o IBAMA (1990), a revegetação é a prática mais adequada para se obter a formação de um novo solo, controlar a erosão, evitar a poluição das águas, e se for escolhida a manutenção da vida selvagem como uso futuro do solo, promover o retorno da mesma. Os plantios servem ainda como poleiros, atraindo principalmente aves e morcegos dispersores de frutos e sementes, responsáveis pela introdução de novas espécies na área.

## **2.3. As Leguminosas**

A família Leguminosae compreende cerca de 20000 espécies espalhadas por todo o mundo com exceção das ilhas Malvinas e Antártida (SPRENT, 2001). É dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpiniodeae, as quais se prestam a uma gama de utilizações, como produção de grãos, forragens, carvão e celulose, madeira, adubação verde e arborização (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

A implantação de Leguminosas florestais é uma alternativa para a reabilitação e transformação dos substratos de áreas mineradas. Essas espécies podem crescer em solos com limitações de fertilidade, além de favorecer uma incorporação relativamente rápida de

quantidades substanciais de matéria orgânica e nitrogênio ao solo, facilitando o estabelecimento de espécies não fixadoras e mais exigentes nutricionalmente.

Isso se deve ao fato de que muitas destas espécies possuem a capacidade de se associar com bactérias que formam nódulos e transformam o  $N_2$  do ar em compostos nitrogenados, assimiláveis pelos vegetais.

Resultados positivos da recuperação com o uso de leguminosas associadas a microrganismos tanto em áreas de mineração como em áreas degradadas por outras atividades, são encontrados em vários trabalhos (FRANCO et al, 1996; FARIA et al, 2002; CHADA et al, 2004).

#### **2.4. O nitrogênio**

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre. Nas plantas é o componente responsável por várias reações além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Cerca de 78% do ar atmosférico é constituído por esse elemento. Apesar disso, não é utilizado de forma direta pelos seres vivos, com exceção de alguns microrganismos, como as bactérias diazotróficas.

A associação entre planta e bactéria apresenta grande importância do ponto de vista econômico e ecológico, podendo dispensar total ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados industriais, e com isso viabiliza o plantio das espécies reduzindo os custos com esse insumo (BARBERI et al.,1998).

O nitrogênio atmosférico também pode ser transformado através de processos industriais, como o Haber-Bosch, que produzem os fertilizantes nitrogenados. Entretanto, estes fertilizantes geralmente têm baixo aproveitamento agrônomico e podem ser poluentes do solo, água e atmosfera (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), além de acelerar a decomposição da matéria orgânica, diminuir a capacidade de aeração e retenção de água, afetando o desenvolvimento das raízes.

#### **2.5. A Simbiose e a fixação biológica de nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo pelo qual o  $N_2$  atmosférico é reduzido a  $NH_4^+$ , podendo dessa forma, ser transferido para compostos contendo carbono, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN *et al.*, 2001). Segundo FARIA *et al.* (2003), a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas é realizada por bactérias vulgarmente chamadas de rizóbio, que ao se associarem com as plantas formam estruturas denominadas nódulos. Em troca a planta fornece metabólitos ao microrganismo, e tem-se assim uma simbiose mutualista.

Diversos fatores influenciam a fixação biológica de nitrogênio em Leguminosas. Tanto os fatores bióticos como os abióticos podem atuar sobre a bactéria e/ou sobre o hospedeiro afetando a simbiose. De acordo com MOREIRA & SIQUEIRA (2006), os fatores limitantes são: a) características intrínsecas da espécie hospedeira (capacidade de nodular); b) fatores edáficos como o pH e o nitrogênio mineral presente no solo; c) clima; e d) populações de bactérias nativas do solo.

As quantidades de  $N_2$  fixado e os efeitos da inoculação na produção dependem muito da estirpe de rizóbio empregada e da leguminosa cultivada (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). A formação de nódulos não representa necessariamente que a estirpe de rizóbio esteja fixando nitrogênio eficientemente, o que resulta em gasto energético para a planta.

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 & SIQUEIRA, 2002). Dessa forma, a seleção de estirpes

eficientes para cada espécie de leguminosa, visando a produção de inoculantes específicos, é um dos componentes fundamentais para o sucesso da tecnologia de uso de espécie arbórea (FARIA, 2000).

## **2.6. A Metodologia de seleção de estirpes**

A metodologia para seleção de estirpes para leguminosas florestais segue quatro bases de recomendação. Na base de recomendação I, a seleção é feita em condições estéreis de laboratório para testar se a bactéria purificada é rizóbio e se possui a capacidade de nodular a planta testada.

Para a base de recomendação II as estirpes são testadas em vasos Leonard em casa de vegetação, utilizando substrato esterilizado. Os testes realizados em casa de vegetação utilizando substrato estéril possibilitam comprovar que 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.

A base de recomendação III é feita em vasos com solo não estéril, avaliando a competitividade das bactérias testadas com as estirpes nativas do solo. Dos resultados obtidos nos experimentos em condições esterilizadas, selecionaram-se as estirpes e testaram-se as mesmas em vasos de solo não estéril com o mesmo hospedeiro.

Esta etapa verifica a eficiência, eficácia e a competitividade das estirpes inoculadas frente às nativas do solo.

A etapa IV consiste no teste em condições de campo e/ou viveiro das estirpes selecionadas na etapa III (FARIA, 2000).

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Experimento em condições estéreis- Base de recomendação II**

#### **3.1.1 Montagem do experimento**

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação estéril na Embrapa Agrobiologia (Figura 1). As leguminosas estudadas nestas condições foram: *D. leiocarpum*, *T. adunca* e *M. xanthocentra*, todas herbáceas. Foram utilizados vasos de “Leonard”, contendo como substrato areia e vermiculita (2:1,v: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 contém a solução nutritiva para as plantas.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Os tratamentos foram: testemunhas nitrogenadas 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. As estirpes testadas foram as de maior eficiência nos experimentos anteriores, de acordo com GONÇALVES et al., (2007), e as bactérias isoladas de espécies vegetais taxonomicamente próximas à espécie alvo. A Tabela 1 apresenta as estirpes utilizadas, seu hospedeiro inicial e sua origem.

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

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 caesalpiniiifolia</i>	Embrapa Agrobiologia(RJ)
BR 3432	<i>Mimosa acutistipula</i>	Fortaleza (BA)
BR 3450	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</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>	Linhares (ES)
BR 3463	<i>Mimosa flocculosa</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3466	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3467	<i>Mimosa pellita</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>	Linhares (ES)
BR 3522	<i>Mimosa setosa</i>	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>	Linhares (ES)
BR 3610	<i>Acacia auriculiformes</i>	Linhares (ES)
BR 3611	<i>Acacia podalyriifolia</i>	Linhares (ES)
BR 3617	<i>Acacia mangium</i>	Linhares (ES)
BR 3624	<i>Acacia auriculiformes</i>	Linhares (ES)
BR 3628	<i>Acacia saligna</i>	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>	Linhares (ES)



BR 3815	<i>Chamaecrista cathartica</i>	Mariana(MG)
BR 3901	<i>Melanoxylum brauna</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4007	<i>Prosopis juiflora</i>	Fortaleza (CE)
BR 4017	<i>Prosopis chilensis</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4101	<i>Ormosia nitida</i>	Linhares (ES)
BR 4103	<i>Ormosia nitida</i>	Linhares (ES)
BR 4301	<i>Calliandra 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>	Linhares (ES)
BR 5005	<i>Dimorphandra jorgei</i>	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>	Linhares (ES)
BR 5610	<i>Falcataria moluccana</i>	Linhares (ES)
BR 5611	<i>Falcataria moluccana</i>	Linhares (ES)
BR 5613	<i>Albizia procera</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6009	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Linhares (ES)
BR 6010	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Linhares (ES)
BR 6205	<i>Albizia saman</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6609	<i>Inga sessilis</i>	Paulo Murinho(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>Trifloium 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)
BR 8205	<i>Poecilanthe parviflora</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 824	<i>Leucaena leucocephala</i>	Linhares (ES)
BR 827	<i>Leucaena leucocephala</i>	Linhares (ES)
BR 8601	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Linhares (ES)

BR 8603	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Linhares (ES)
BR 8651	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8653	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8801	<i>Glirícidea sepium</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 9002	<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 9004	<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
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)
SMF 697-1	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-11	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-12	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-3	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-5	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-7	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
SMF 697-8	<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)



**Figura 1.** Casa de vegetação, Embrapa Agrobiologia.

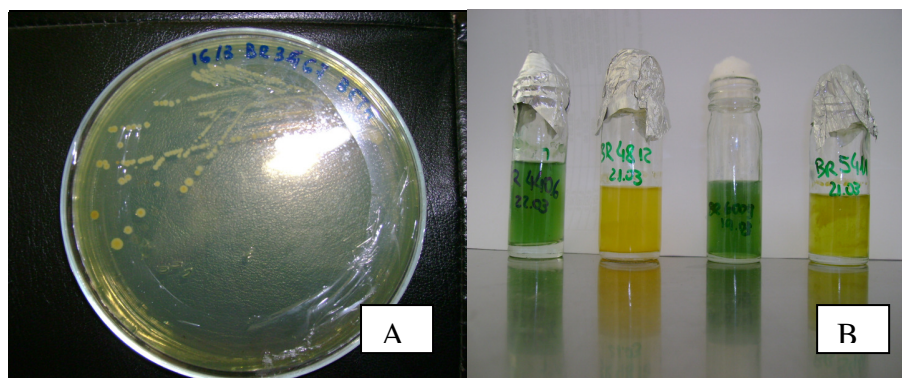
### **3.1.2. Sementes**

As sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado durante 5 minutos, esterilizadas superficialmente em  $H_2O_2$  (30%) por 5 minutos e em seguida lavadas com água esterilizada (10x). Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas, que continham filtro de papel e algodão umedecidos e levadas a câmara de germinação até a emissão da radícula. Cada vaso de Leonard recebeu quatro plântulas.

### **3.1.3 Inoculação**

No preparo do inóculo colônias puras de bactérias (Figura 2A) foram repicadas em tubos contendo 10 mL de meio 79 semi-sólido (FRED & WAKSMAN, 1928), (Figura 2B). A fim de acelerar a multiplicação, as bactérias ficaram sob agitação horizontal orbital (150 rpm), na temperatura de 27°C.

Após o crescimento das colônias, que variou entre 3 e 7 dias, realizou-se a inoculação. No momento do plantio, foi adicionando com uma pipeta de precisão, 1 mL de inóculo ( $1 \times 10^8$  bactérias  $mL^{-1}$ ) por plântula. Ao fim da inoculação cobriu-se as plântulas com areia estéril.



**Figura 2A.** Isolados crescidos em meio 79 sólido; **2B.** Isolados crescidos em meio 79 semi-sólido

### 3.1.4 Condução do experimento

Após 15 dias foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma plântula por vaso de Leonard. Todos os tratamentos receberam quinzenalmente solução nutritiva (Anexo A) segundo Norris, citada por GRUZSMAN & DÖBEREINER (1968). Semanalmente as testemunhas nitrogenadas receberam doses de nitrogênio mineral contendo 5mg 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:

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

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:

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

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.

## **3.2. Experimentos em condições não estéreis- Base de recomendação III**

### **3.2.1. Montagem do experimento**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação não estéril da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. As leguminosas estudadas foram *D. leiocarpum*, *T. adunca* e *M. somnians*. 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 também pré-selecionadas no experimento em vasos de Leonard (base de recomendação II).

### **3.2.2. Sementes**

As sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos, esterilizadas superficialmente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), lavadas com água estéril (10X), colocadas em placas de Petri com algodão e papel de filtro umedecido, devidamente esterilizado. Posteriormente foram levadas para germinação, até a emissão da radícula.

### **3.2.3. Inoculação**

As bactérias foram cultivadas em meio 79 semi-sólido (FRED & WAKSMAN, 1928) sob agitação horizontal orbital (150 rpm) até apresentarem crescimento. A inoculação foi realizada no momento do plantio adicionando 1mL (1X10<sup>8</sup> bactérias mL<sup>-1</sup>) por plântula.

### **3.2.4. Condução do experimento**

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. Foi obtida 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 seguintes equações: [(MPAS tratamento/MPAS testemunha absoluta) x100] e [(MPAS tratamento/MPAS da testemunha nitrogenada) x100], respectivamente.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Experimentos em condições esterilizadas- Base de recomendação II**

#### **4.1.1. *Desmodium leiocarpum***

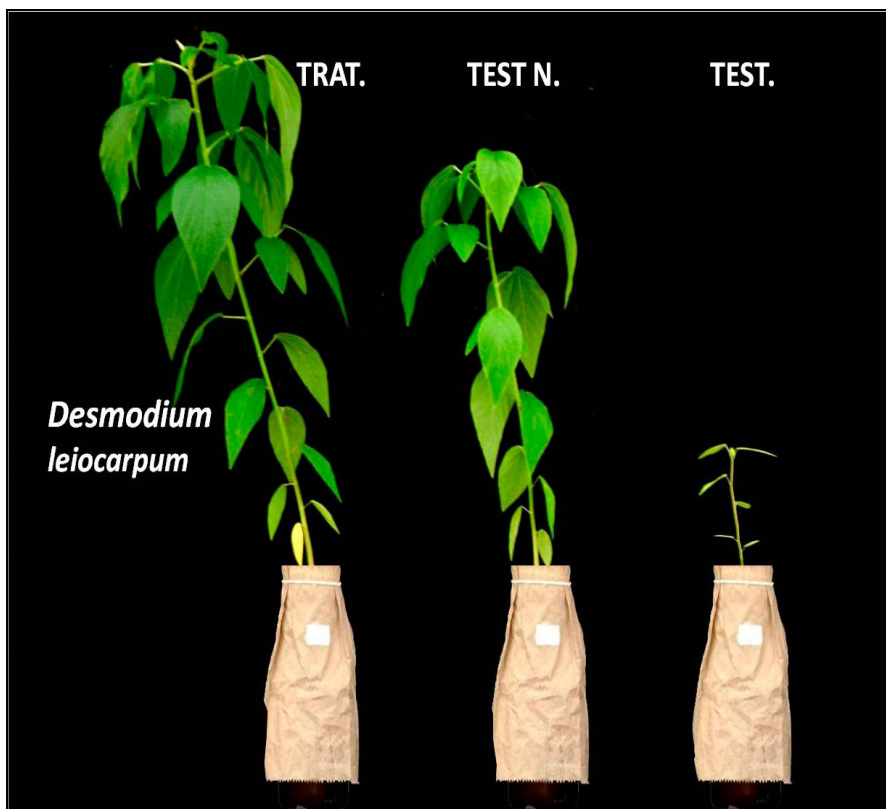
O experimento foi coletado aos 104 dias após o plantio (Figura 3). Das 54 estirpes testadas, 37 proporcionaram nodulação. Os resultados obtidos com relação à massa de parte aérea seca, de nódulos, eficiência e eficácia das estirpes que promoveram a nodulação são apresentados na Tabela 2.

Com o total de 495 mg/N adicionado, a testemunha mineral com adição de nitrogênio que mais respondeu ao tratamento nitrogenado foi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para este tratamento foi observado um acúmulo de 1,69 gramas de matéria seca por planta e este valor foi utilizado para o cálculo de eficácia. A quantidade de N aplicado foi inferior ao ideal da espécie, pois o melhor tratamento inoculado teve uma eficiência maior que o tratamento nitrogenado.

As estirpes que proporcionaram os maiores acúmulos de massa de parte aérea seca foram as estirpes BR 6610 e BR 2216 apresentando respectivamente desenvolvimento 14 e 18 vezes maior quando comparadas à testemunha absoluta.

Os resultados apresentados pelas estirpes, BR 7409, BR 5613, BR 281, BR 3467, BR 3405, BR 6610 e BR 2216 apresentaram eficiência e eficácia elevada em condições controladas, o que pode possibilitar a substituição parcial ou total da aplicação de nitrogênio mineral para esta espécie em programas de revegetação. Para tanto, novos experimentos devem ser realizados, em diferentes condições.

A estirpe BR 2216 isolada de *Desmodium sp.* apresentou a maior eficiência na FBN para *Desmodium leiocarpum*, o que pode sugerir algum nível de especificidade desta bactéria para este gênero de planta, uma vez que, resultados similares foram observados para outra espécie do mesmo gênero *Desmodium cf. triflorum* (LASTE et al., 2008).



**Figura 3:** Comparação entre os melhores tratamentos, a testemunha nitrogenada e a testemunha absoluta para *Desmodium leiocarpum*.

**Tabela 2.** Acúmulo de massa da parte aérea seca e de nódulos, eficiência e eficácia dos tratamentos para *Desmodium leiocarpum*, coletado aos 104 dias após o plantio.

Tratamento	Massa				%	
	Parte aérea (g)		Nódulos (mg)		Eficiência <sup>1</sup>	Eficácia <sup>2</sup>
<b>TN3 KNO3</b>	<b>0,09</b>	b	<b>0,000</b>	<b>a</b>	<b>37,5</b>	<b>5</b>
SMF 697-12	0,18	b	20,01	a	75	10
<b>T. absoluta</b>	<b>0,24</b>	<b>b</b>	<b>0,000</b>	<b>a</b>	<b>100</b>	<b>14</b>
BR 7601	0,29	b	10,05	a	120	17
BR 4812	0,39	b	10,15	a	162	23
BR 5004	0,41	b	10,00	a	170	24
BR 3505	0,58	b	20,14	a	241	34
BR 4406	0,61	b	20,33	a	254	36
BR 3608	0,65	b	30,25	a	270	38
BR 6822	0,70	b	20,14	a	291	41
SMF 697-3	0,79	b	20,47	a	329	46
BR 3611	0,84	b	30,14	a	350	49
BR 96	0,87	b	50,47	a	362	51
SMF 697-7	0,89	b	20,44	a	370	52
BR 5609	0,96	b	40,55	a	400	56
<b>TN1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>0,99</b>	<b>b</b>	<b>0.000</b>	<b>a</b>	<b>412</b>	<b>58</b>
BR 5411	1,00	b	40,86	a	416	59
BR 1405	1,03	b	60,41	a	429	60
BR 3454	1,04	b	40,20	a	433	61
BR 4301	1,10	b	40,26	a	458	65
BR 3631	1,11	b	30,85	a	462	65
BR 6815	1,13	b	30,75	a	470	66
BR 8003	1,14	b	40,89	a	475	67
BR 8601	1,23	b	30,55	a	512	72
BR 8205	1,35	b	30,95	a	562	79
BR 6009	1,36	b	50,45	a	566	80
BR 3901	1,48	b	40,44	a	616	87
SMF 697-11	1,68	a	70,58	a	700	99
<b>TN2(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>1,69</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>a</b>	<b>704</b>	<b>100</b>
BR 3609	1,76	a	40,90	a	733	104
BR 3469	1,87	a	90,12	a	779	110
BR 6205	1,98	a	40,70	a	825	117
SMF 697-8	1,98	a	40,80	a	825	117
SMF 697-5	2,01	a	50,70	a	837	118
BR 7409	2,16	a	60,65	a	900	127
BR 5613	2,26	a	50,75	a	941	133
BR 281	2,92	a	80,20	a	1216	172
BR 3467	2,92	a	90,50	a	1216	172
BR 3405	3,28	a	100,3	a	1366	194
BR 6610	3,37	a	110,8	a	1404	199
BR2216	4,43	a	90,45	a	1845	262
CV%	144,79		120,0			

Médias comparadas pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ )

1.Eficiência: (MSPA trat./MSPA tabs x 100).

2.Eficácia (MSPA trat./MSPA TN x 100).

#### 4.1.2 *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 3).

Na Figura 4 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.

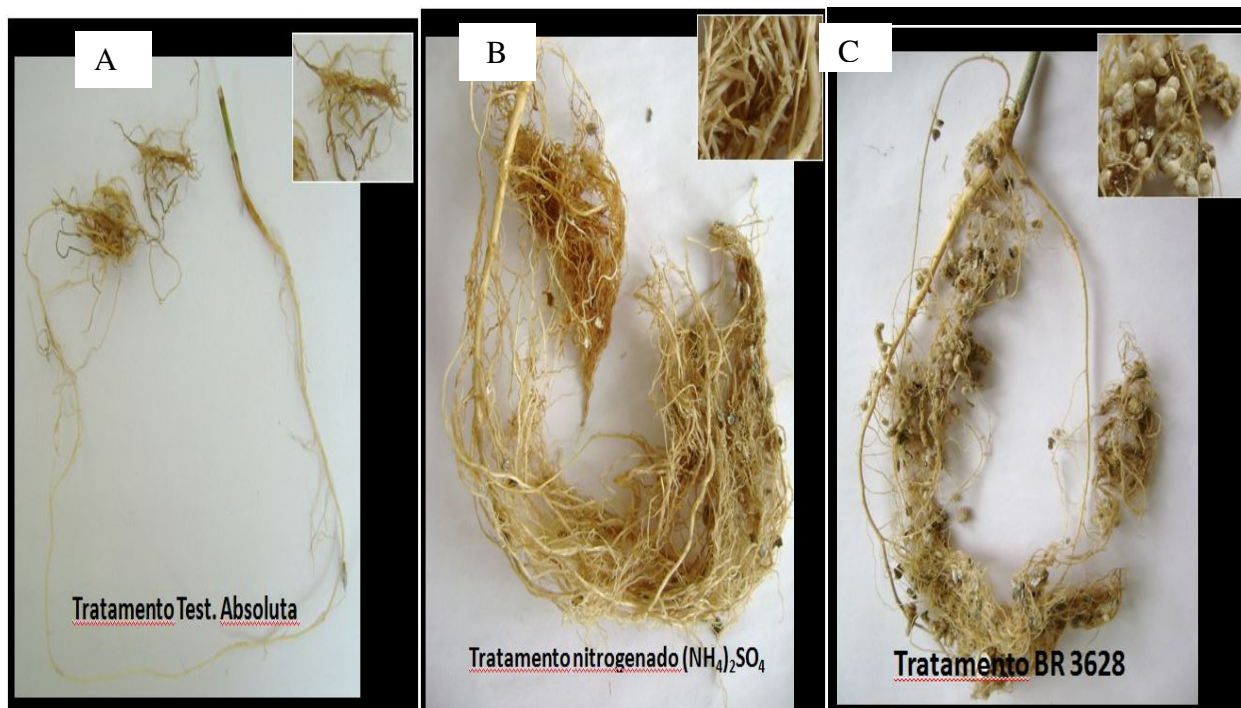
Os tratamentos que receberam nitrogênio mineral (825 mg) não diferiram estatisticamente em si pelo teste Scott Knott 5%, no entanto a fonte de N que proporcionou o maior incremento de massa de parte aérea seca (MPAS) foi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

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* indicam 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. Houve diferença estatística entre os tratamentos para os parâmetros avaliados.

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



**Figura 4.** Desenvolvimento da raiz A.tratamento absoluto B.tratamento nitrogenado e C.tratamento inoculado.



**Tabela 3.** 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	0.2
BR 3505	0,02	b	0,630	b	50	0.4
BR 9004	0,02	b	2,700	b	50	0.4
BR 6009	0,03	b	8,770	b	75	0.6
<b>T absoluta</b>	<b>0,04</b>	<b>b</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>100</b>	<b>0.8</b>
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	6
BR 5401	0,44	b	3,930	b	1100	9
BR 4007	0,46	b	26,90	b	1150	10
BR 7407	0,62	b	18,83	b	1550	13
BR 281	0,79	b	35,23	b	1975	17
BR 3631	0,92	b	43,13	a	2300	19
BR 1405	1,05	b	15,20	b	2625	22
BR 4101	1,17	b	16,30	b	2925	25
BR 4301	1,19	b	23,37	b	2975	25
BR 96	1,27	b	70,27	a	3175	27
BR 3630	1,44	a	60,12	a	3600	30
BR 3466	1,52	a	5,670	b	3800	32
BR 5610	1,59	a	59,30	a	3975	34
<b>TN3 KNO<sub>3</sub></b>	<b>1,63</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>4075</b>	<b>34</b>
BR 3611	1,64	a	57,20	a	4100	35
SMF 597-2	1,68	a	35,10	b	4200	35
SMF 597-5	1,83	a	25,83	b	4575	38
BR 3509	1,94	a	26,70	b	4850	41
BR 8601	1,95	a	70,87	a	4875	41
BR 3609	2,01	a	86,63	a	5025	42
BR 6815	2,05	a	37,03	b	5125	43
BR 3611	2,17	a	54,90	a	5425	46
BR 4406	2,49	a	42,37	a	6225	53
BR 6822	2,64	a	58,70	a	6600	56
BR 6205	2,84	a	18,13	b	7100	60
BR 5613	2,99	a	63,40	a	7475	63
BR 5004	3,04	a	55,53	a	7600	64
BR 5609	3,31	a	73,67	a	8275	70
BR 5301	3,32	a	87,67	a	8300	70
<b>TN1 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)</b>	<b>4,20</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>10225</b>	<b>89</b>
BR 5303	4,36	a	114,47	a	10900	92
BR 3628	4,40	a	133,73	a	11000	93
<b>TN2(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>4,73</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>10500</b>	<b>100</b>
%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

### 4.1.3 *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 4).

Para essa espécie sugere-se novo experimento a fim de selecionar novas estirpes, já que os melhores resultados apresentam eficácia apenas de 50%.

**Tabela 4.** 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
<b>TABSOLUTA</b>	<b>0.150</b>	<b>c</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>100</b>	<b>8</b>
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
<b>TN3 (KNO<sub>3</sub>)</b>	<b>0.399</b>	<b>c</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>266</b>	<b>22</b>
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
<b>TN1 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)</b>	<b>1,063</b>	<b>b</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>708</b>	<b>58</b>
<b>TN2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>1,803</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>b</b>	<b>1202</b>	<b>100</b>
%CV	100		164			

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

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

2.Eficácia=(MPAS TRAT / MPAS TN)\*100

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

### 4.2.1 *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 5). 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 pra suprir a espécie na sua capacidade máxima de absorção deste elemento, pois o melhor tratamento inoculado teve sua MPAS superior ao tratamento nitrogenado.

A estirpe BR 3467 e a estirpe BR 4406 (Tabela 5) são as mais eficientes na FBN para *Desmodium leiocarpum* sob base de recomendação III, diferindo do par encontrado 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 5.** 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
<b>Tabsoluta</b>	<b>13,72 b</b>	<b>258 a</b>	<b>5,08 a</b>	<b>100</b>	<b>85</b>
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
<b>TN <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math></b>	<b>16,23 a</b>	<b>187 a</b>	<b>6,75 a</b>	<b>118</b>	<b>100</b>
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



**Figura 5.** Competitividade das estirpes inoculadas que proporcionaram bom desenvolvimento em *D.leiocarpum*, em substrato não esterilizado.

#### 4.2.2 *Tephrosia adunca*

A coleta ocorreu aos 59 dias após o plantio, quando os tratamentos apresentavam diferença visual em altura (Figura 5).

Das 6 estirpes testadas, as duas que proporcionaram 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 6).

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 et al. 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 (FARIA & 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.

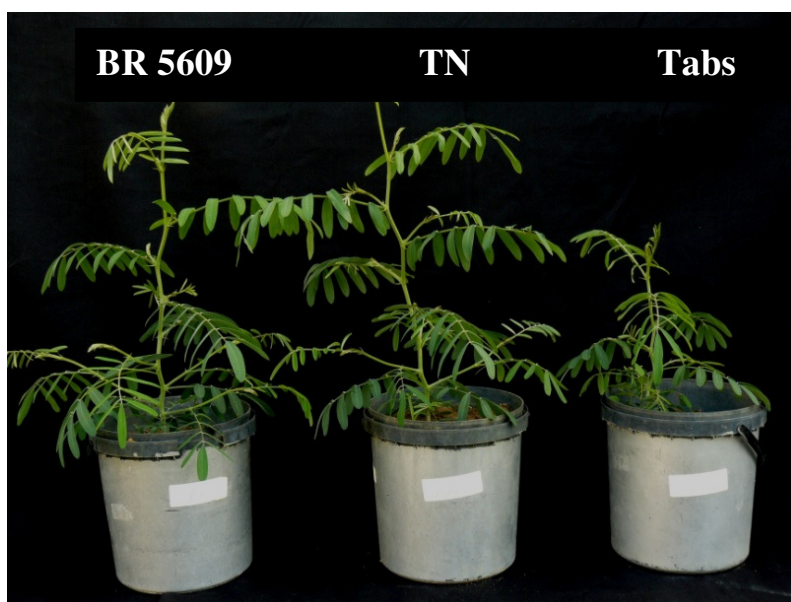
**Tabela 6.** Acúmulo de massa da parte aérea seca, de nódulos, raiz, eficiência e eficácia dos tratamentos para *T. adunca*, cultivada em vaso com solo.

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
<b>Tabsoluta</b>	<b>2,35 a</b>	<b>18,9 b</b>	<b>0,56 a</b>	<b>100</b>	<b>59</b>
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
<b>TN (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)</b>	<b>3,95 a</b>	<b>0,800 b</b>	<b>0,46 a</b>	<b>168</b>	<b>100</b>
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



**Figura 5.** Tratamento inoculado, testemunha nitrogenada e testemunha absoluta de *Tephrosia adunca* em vaso de solo não estéril.

#### 4.2.3 *Mimosa somnians*

Este experimento teve duração de 100 dias. Os resultados encontrados no experimento estão demonstrados na Tabela 7.

A quantidade de nódulos encontrados na testemunha absoluta sem inoculante e sem nitrogênio mineral indica a presença de estirpes nativas no solo. Entretanto, 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 725mg 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 e BR 3474 e a estirpe BR 3477 isolada de *Mimosa sp.*, selecionadas em experimento em condições estéreis (dados não publicados), confirmaram sua eficiência em vaso de solo, sob condições não estéreis.

**Tabela 7.** 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> (%)
<b>Tabsoluta</b>	<b>4,18</b>	<b>a</b>	<b>45,7</b>	<b>a</b>	<b>4,98</b>	<b>a</b>	<b>100</b>	<b>56</b>
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
TN2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	<b>7,46</b>	<b>a</b>	<b>0,000</b>	<b>a</b>	<b>9,61</b>	<b>a</b>	<b>178</b>	<b>100</b>
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

Os resultados deste trabalho evidenciam as possibilidades de seleção de pares simbioses eficientes quanto ao processo de fixação biológica de nitrogênio, que é um passo fundamental para estabelecimento de espécies de plantas em áreas degradadas.

## 5. CONCLUSÃO

As estirpes selecionadas com maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio em condições estéreis foram BR 2216 e BR 6610 para *D. leiocarpum*, BR 3628 e BR 5303 para *T. adunca* e BR 3454 e BR 3523 para *M. xanthocentra*. 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.

Nos experimentos em condições estéreis a fonte de nitrogênio mineral que proporcionou o maior desenvolvimento em *D. leiocarpum* foi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em *T. adunca* foi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e em *M. xanthocentra*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

## 6. 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.
- CHADA, S. de S.; CAMPELLO, E.F.C.; FARIA, S.M. de. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista árvore**, v.28, n.6, p.801-809, 2004.
- DIAS, L.E. & GRIFFITH, J.J. Conceituação e caracterização de áreas de degradadas. *In*: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Eds.). **Recuperação de Áreas Degradadas**. Viçosa: UFV/ DS/ SOBRADE, p. 1-7. 1998.
- FARIA, S.M. de. & GUEDES, R.E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999)**. Embrapa-CNPAB; p.2,1999.
- 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), 2000.
- FARIA, S. M. de. & FRANCO, A.A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 16.p (Embrapa Agrobiologia. Documento, 158), 2002.
- FARIA, S. M. de.; MOREIRA, J. F.; CORDEIRO, F. C.; MACHADO, R. L. **Obtenção de estirpes de rizóbio para leguminosas florestais (aproximação de 2004)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 5 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado técnico 61), 2003.
- FARIA, S. M. de.; SILVA, M.G.; GRAIG, J. e DIAS, S. L.; LIMA, H. C.; NARA, M. **Revegetação com espécies arbóreas fixadoras de nitrogênio em taludes de exploração de ferro na Samarco Minerações Mariana MG**. *In*: Água e biodiversidade. Palestras... Belo Horizonte 521-522.p. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5,. Belo Horizonte, MG. 2002
- 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, 209-234p. 2000.
- 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**. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB; 71p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 27). 1996.

- FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. **Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico.** In: ESTEVES, F. de A. (Coord.) Estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro, 459-467p. (Oecologia Brasilienses, v. 1), UFRJ, 1995.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil.** New York: Mcgraw-Hill Book Company, New York, 145p., 1928.
- GONÇALVES, F.S.; LASTE, K.C.D.; UCHÔAS, B.S.; BORGES, W.L.; FARIA, S.M. de. **Especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio dentro da família Leguminosae.** In XVII Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007.
- GRUZMAN, I. & DÖEBEREINER, J. **Reunião Latino Americana sobre Inoculantes para Leguminosas.** Anais... Porto Alegre: UFRGS, p. 84, 1968.
- HERMANN, H. Recuperação sócio-ambiental de áreas mineradas. IN: ALBA, J.M.F. **Recuperação de áreas mineradas a visão dos especialistas brasileiros.** Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2007. p. 87-97.
- IBAMA. **Manual de Recuperação de Áreas Degradadas pela Mineração: Técnicas de Revegetação.** Brasília: IBAMA, 96 p. 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO - IBRAM. **Mineração e Meio Ambiente.** Belo Horizonte: IBRAM, 56p. 1987.
- LASTE, K.C.D.; GONÇALVES, F.S.; FARIA, S. M. de. **Estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com *Desmodium cf. triflorum*.** In: FertBio. Londrina-PR.
- 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, Ribeirão Preto. **Resumos...** Botucatu: SBCS, 2003. 4 p. CD ROM.
- MILAN, P. A., RITTER, W. & DALL'AGNOL, M. **Seleção de leguminosas forrageiras tolerantes a alumínio e eficientes na utilização de fósforo.** Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, 26(1): 119-124, janeiro de 1999.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 1º ed., Editora UFLA. 626p. 2002.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, O. S. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2º ed. Atual e Aplicada, Lavras, Ed. UFLA, p.729, 2006.



- OLDEMAN, L.R. **The global extent of soil de gradation**. In: Soil Resilience and Sustainable Land Use. GREENLAND, D. J. & SZABOCLS, I (Eds.) Cab International, Wallingford, VK, p. 99-118. 1994.
- RAVEN, P.; EVETR, R.R; EICHHORN,S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.307-311. 2001.
- REIS, L. L. Monitoramento da recuperação ambiental de áreas de mineração de bauxita da Floresta Nacional de Saracá-Taquera, Porto Trombetas(PA)-Tese (doutorado), UFRRJ, 159 p.,2006.
- REISSMANN, C.B. **Contribuição do *Pinus taeda* na recuperação de solos degradados em áreas de empréstimos/ um estudo de caso com horizontes orgânicos**. In: Il Curso de Atualização-Recuperação de Áreas Degradadas. Curitiba, Paraná. Apostila, 135-140 p. 1996.
- SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.
- SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. **Biotechnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 236 p, 1988.
- SUMÁRIO MINERAL. **Sumário Mineral 2008 -DNPM**. Disponível em:<<http://www.dnpm.gov.br>>
- VINCENT, J. M. **A Manual for de pratical study of root-nodule bactéria**. london: **international biological programme HANDBOOK**, 15, 1970.

## ANEXO A

Solução para vasos de Leonard, segundo Norris (modificada).

Utilizada para florestais, dissolvida em 40L de água :

1)KCL .....	5,96g
2)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,00g
3)KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	4,00g
4)CASO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	13,76g
5)MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	19,72g
6)CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O .....	0,15g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,44g
MnSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	0,40g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0,02g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1,40g
7)FeEDTA.....	1,32g
8)Ácido cítrico.....	0,2g

Completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Esterilizar.