

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE SOLOS DA AMAZÔNIA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS

Rebeca Patricia OMENA-GARCIA¹; Luiz Antonio de OLIVEIRA².

1. Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Bolsista PIBIC/CNPq); 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA (Orientador - INPA/CPCA)

1. Introdução

A fixação biológica do nitrogênio é uma alternativa de baixo custo, reduzindo as aplicações de fertilizantes, contribuindo para o que é buscado mundialmente, uma agricultura sustentável (Jensen e Hauggaard-Nielsen, 2003). As bactérias (rizóbios) são uma das responsáveis por esse processo, que em simbiose com a planta, pode elevar sua produção. Os rizóbios também podem solubilizar fosfatos insolúveis presentes nos solos, disponibilizando o fósforo para as plantas. Dessa forma eles podem ser usados como biofertilizantes, reduzindo o uso de adubos nitrogenados e fosfatados.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) pode obter da associação com o rizóbio, o nitrogênio necessário para altas produções (Sanginga, 2003). A eficiência no processo de fixação biológica do nitrogênio pode ser prejudicada em função das diferentes condições edafoclimáticas de regiões produtoras (Stamford *et al.*, 1988; Hungria *et al.*, 2001). Estas bactérias muitas vezes não são capazes de se desenvolver e serem eficientes quando submetidas a condições de clima e solo adversos (Hungria *et al.*, 1999), bem como não tem sido selecionadas para as variedades locais mais utilizadas pelos agricultores. Essa problemática sinaliza a necessidade de estudos localizados buscando aumentar a eficiência do processo e potencializar seu uso, através do isolamento e seleção de rizóbio eficiente e adaptado tanto às condições edafoclimáticas quanto às cultivares utilizadas nas regiões produtoras

O presente trabalho teve por objetivo, coletar e isolar estirpes e espécies de rizobia em plantas e solos de terra-firme na Amazônia, estudar em laboratório o efeito de condições estressantes no crescimento de estirpes (teste de tolerância à acidez e Al tóxico) em meio de cultura e em solução nutritiva e avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio de estirpes de rizóbio isolados.

2. Material e Métodos

Coletaram-se quinze amostras de solos em três locais distintos, do município de Presidente Figueiredo, Amazonas. As amostras serviram de fonte de inóculo em sementes de feijão caupi como planta isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulos. O ensaio foi realizado em casa de vegetação na CPCA no INPA. Utilizou-se subamostras (30g) para servirem como fonte de inóculo das populações e posterior avaliação da população de rizóbia. Usou-se areia e solução nutritiva esterilizadas (Oliveira, 1988) em copos plásticos com capacidade para 770g. Aproximadamente 45 dias após a germinação, as plantas foram coletadas e secadas em estufa para a determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) e número de nódulos (NN) por vaso. Dos nódulos formados, foram isoladas as estirpes (total de 8 estirpes obtidas), bem como escolheram-se para os posteriores testes, 25 isolados de rizobia da coleção da CPCA, INPA.

Para o teste de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico, os tratamentos utilizados foram meios YMA com pH 4,5+2,0 cmolc(+)/L e, pH 6,5, com quatro repetições cada. Verificou-se a alteração do pH do meio ocasionado pelas bactérias, pela alteração da cor do meio em consequência da adição do corante bromocresol verde (meio com pH 4,5+Al) e azul de bromotimol (meio com pH 6,5). A avaliação do crescimento das bactérias foi feita a partir do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999). As avaliações foram feitas a cada três dias, começando a primeira avaliação no quinto dia de incubação do rizóbio, durante um período de 17 dias. De acordo com o crescimento celular nas respectivas zonas, foram dados valores de crescimento para cada estirpe variando de 1 (sem crescimento visível após riscagem) a 4 (máximo crescimento). Este método permite ainda a classificação das estirpes de acordo com o grau de tolerância, se sensível (intervalo de crescimento na pontuação de 1,00 à 2,00), mediano (pontuação entre 2,06 à 3,00) ou tolerante (pontuação entre 3,06 à 4,00).

Quanto à capacidade das estirpes em solubilizarem fosfatos de cálcio e de alumínio, utilizou-se dois meios específicos para bactérias solubilizadoras, sendo um para solubilizadora de fosfato de cálcio

e um para fosfato de alumínio (Hara e Oliveira, 2004, 2005). As bactérias foram avaliadas por um período de 15 dias, cujas medidas do diâmetro (ϕ) dos halos de solubilização e ϕ das colônias foram tomadas a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas, obteve-se os índices de solubilização para cada estirpe através da fórmula: $IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$ (Berraquero *et al.*, 1976). Baseado neste, as bactérias foram classificadas como estirpes com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces (solubilização a partir do terceiro dia), normais (início da solubilização entre 4-7 dias), tardia (início da solubilização após o sétimo dia) e "não solubilizadoras aparentes".

3. Resultados e discussão

As fontes de inóculos utilizadas no experimento com amostras de solo do Município de Presidente Figueiredo não promoveram aumento significativo no rendimento da matéria seca da parte aérea e total tendo em vista os poucos nódulos formados e em apenas alguns tratamentos (Tabela 1). Todos os vasos receberam as mesmas quantidades da solução nutritiva e os resultados de matéria seca da parte aérea, raiz e total comprovam que houve uma deficiência generalizada de nitrogênio, devido aos baixos pesos das plantas. O número de nódulos eficientes observados e coletados das raízes das plantas foi baixo ou ausente, indicando que as amostras de solo não continham ou tinham uma pequena quantidade de rizóbios compatíveis com o feijão caupi.

Tabela 1. Solos coletados em Presidente Figueiredo com seus respectivos tratamentos, matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) de feijão caupi.

Inóculos	Cultura e tratamentos dos solos	MSPA	MSR	MST	NN/vaso
T1	Testemunha ⁽¹⁾	0,39	0,25	0,64	0
T2	Piquiá (solos sem tratamento)	0,36	0,15	0,51	0
T3	Açaí (solos sem tratamento)	0,37	0,11	0,49	0
T4	Abacaba (solos sem tratamento)	0,42	0,13	0,56	0
T5	Rambutam (solos sem tratamento)	0,39	0,15	0,54	2
T6	Cupuaçú (solos sem tratamento)	0,37	0,12	0,49	0
T7	Cupuaçú (2ton/há calcário+2ton/ha casca de cupuaçú triturado+3ton/ha mat. vegetal do ingá)	0,43	0,11	0,54	0
T8	Cupuaçú (2ton/ha casca de cupuaçu triturada+3ton mat. vegetal de ingá)	0,44	0,14	0,58	0
T9	Cupuaçú (2ton/ha calcário+ 2ton/há casca de cupuaçu triturada)	0,52	0,13	0,64	0
T10	Cupuaçú (2ton/ha de calcário)	0,35	0,12	0,47	0
T11	Cupuaçu (2ton/ha casca de cupuaçú triturada)	0,38	0,12	0,50	0
T12	Cupuaçú (2ton/ha calcário+ 2ton/ha de casca de cupuaçu triturada)	0,36	0,11	0,47	4
T13	Cupuaçú (2ton/ha calcário+ 2ton/ha casca de cupuaçu triturada+3ton/ha mat. Vegetal do ingá)	0,36	0,10	0,46	0
T14	Cupuaçú (2ton/ha casca de cupuaçu triturada+3ton/há mat. Vegetal do ingá)	0,34	0,13	0,47	0
T15	Cupuaçú (2ton/ha de calcário)	0,35	0,16	0,51	0
T16	Cupuaçú (2ton/ha casca de cupuaçu triturada)	0,43	0,16	0,59	0
F		0,44 NS	1,66 NS	0,57 NS	0,94 NS
Média		0,39	0,14	0,53	0,5

⁽¹⁾Testemunha: não houve utilização do solo. Vaso apenas com areia autoclavada e solução nutritiva.

Na avaliação de tolerância à acidez (Tabela 2), 32 isolados (95,7%) apresentaram alto crescimento e 1 isolado (4,3%) crescimento médio no meio com pH 6,5 aos 17 dias de avaliação. O baixo crescimento observado para isolados em meio padrão é um indicativo da dificuldade de crescimento em meio de cultura, característica indesejável para indicá-los como inoculantes mesmo em solos com pH próximos a alcalinidade (6,5). Entre os isolados que apresentaram alto crescimento no pH 6,5 aos 17 dias de incubação, quatro apresentaram o crescimento máximo

(escore 4,00) estabilizado já no quinto dia. Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira e Magalhães (1999) e Hara e Oliveira (2004; 2005).

Tabela 2. Crescimento de rizóbios em meio YMA com pH 6,5 e pH 4,5 + Al e alteração do pH do meio após 17 dias de crescimento.⁽¹⁾

Isolados	5 dias		17 dias			
	pH 6,5	pH 4,5+Al	pH 6,5	pH final	pH 4,5+Al	pH final
T5 3a R	4,00	3,81	4,00	<6,5	4,00	4,5
T5 3b R	4,00	3,75	4,00	<6,5	4,00	4,5
T12 1a L	3,88	3,81	4,00	<6,5	4,00	4,5
T12 1a R	3,63	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
T12 1b R	3,75	3,63	4,00	<6,5	3,88	4,5
T12 1c L	3,50	3,19	4,00	<6,5	3,50	4,5
T12 1c R	3,67	3,31	3,75	<6,5	3,81	4,5
T12 1d	3,92	3,88	4,00	<6,5	3,94	4,5
BAF-2	3,81	3,69	4,00	<6,5	4,00	4,5
CB 752	1,06	1,06	4,00	>6,5	3,44	4,5
CP1 ₁	1,56	1,19	3,56	>6,5	4,00	4,5
CP 3	4,00	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
CP 08	1,33	1,21	3,58	>6,5	3,13	4,5
CP-13	3,88	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
FA-329 C	3,75	2,88	3,75	<6,5	3,31	4,5
ST-1	3,94	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
01-520	3,83	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
01-568	1,31	1,19	3,31	>6,5	3,13	4,5
01-576	1,56	1,25	3,44	>6,5	3,50	4,5
01-609	1,06	1,06	3,06	>6,5	3,42	4,5
01-641	1,25	1,19	3,38	<6,5	2,00	4,5
01-642	1,25	1,13	2,75	>6,5	3,25	4,5
02-046	1,31	1,06	3,94	>6,5	3,31	4,5
02-048	1,38	1,25	3,50	>6,5	3,63	4,5
02-053	1,31	1,25	3,31	>6,5	3,38	4,5
02-077	1,25	1,06	3,63	>6,5	3,00	4,5
028-9	1,25	1,25	3,63	>6,5	3,50	4,5
43-7	1,50	1,19	3,75	>6,5	3,50	4,5
507-1	3,58	3,81	3,58	<6,5	3,88	4,5
507-8	2,81	1,56	3,69	<6,5	3,94	4,5
558-2	4,00	3,88	4,00	<6,5	4,00	4,5
558-6	3,94	3,63	4,00	<6,5	3,94	4,5
558-7	3,68	4,00	3,75	<6,5	4,00	4,5

⁽¹⁾Pontuação: 1,00 crescimento não visível; 4,00 máximo crescimento.

Quanto ao crescimento no meio com pH 4,5 + Al, os resultados foram semelhantes aos observados no meio com pH 6,5, com 31 isolados (93,9%) apresentando escores maiores ou igual a 3,06 aos 17 dias de crescimento (Tabela 2), sendo considerados tolerantes à acidez e ao alumínio tóxico. No quinto dia de avaliação, foi observado crescimentos acima de 3,06 no meio com pH 4,5 + Al, para 17 dos isolados. Consequentemente, o tempo de crescimento pode ser usado para a seleção quanto à tolerância à acidez e ao alumínio. Quanto à capacidade de modificar o pH do meio, observou-se esse mecanismo apenas no meio com pH 6,5, no qual 20 isolados (60,6%) diminuíram o pH e 13 (39,4%) aumentaram (Tabela 2). Segundo Barberi *et al.* (2004), a elevação do pH do meio é decorrente do metabolismo da bactéria que, ao atuar sobre o substrato em busca de energia, libera substâncias básicas que aumentam o pH externo.

A Tabela 3 mostra os sete isolados (70%), dos 10, que solubilizaram o fosfato de cálcio (P-Ca), sendo que apenas o 558-2 apresentou alto índice de solubilização final (I.S. = 5,6), e seis apresentaram índice de solubilização baixo, variando de 1,4 a 2,0 mm. Dentre os isolados capazes de solubilizar o fosfato de cálcio, todos (70%) se comportaram como precoces, onde o início da solubilização foi visualizado já no terceiro dia. Os isolados T12 1cR, T12 1cL, 558-2 e 558-6 não apresentaram solubilização aparente durante os 15 dias de avaliação.

Quanto à solubilização de fosfato de alumínio (P-Al), dos 10 isolados testados, nenhum apresentou solubilização aparente em meio com P-Al no período de 15 dias de avaliação (Tabela 3). Segundo Hara e Oliveira (2005), a capacidade de solubilização de P-Al pode estar relacionada ao fato de que o alumínio ligado a ele predomina nos solos da região. Isso indica que os isolados testados não são eficientes quanto à solubilização de P-Al nos solos amazônicos.

Os dados da Tabela 3 evidenciam que dos sete isolados que solubilizaram o P-Ca, nenhum solubilizou o P-Al. Resultados obtidos por Toro *et al.* (1996) e Silva Filho e Vidor (2000) identificaram uma baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos. Silva Filho e Vidor (2000) citam que a baixa frequência de solubilizadores de P-Al se deve ao fato de

inicialmente os isolados serem obtidos em meios contendo o P-Ca para, depois, serem avaliados na presença de P-Al.

Tabela 3. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio de isolados de rizóbio de amostras de solos do Município de Presidente Figueiredo e da Coleção do INPA.

Isolado	Início de Solubilização (dia)	I.S. ⁽¹⁾		Solubilização
		Inicial (mm)	Final (mm)	
T12 1a R	3	1,8 (baixa)	1,6 (baixa)	Precoce
T12 1a L	3	1,8 (baixa)	1,7 (baixa)	Precoce
T12 1c R	0	0,0	0,0	NSA*
T12 1c L	0	0,0	0,0	NSA*
T12 1d	3	1,3 (baixa)	2,0 (baixa)	Precoce
CP 13	3	1,5 (baixa)	1,9 (baixa)	Precoce
507-1	3	1,4 (baixa)	1,4 (baixa)	Precoce
558-6	0	0,0	0,0	NSA*
01-520	3	1,3 (baixa)	1,7 (baixa)	Precoce
T5 3a	0	0,0	0,0	NSA*
558-2	3	5,7 (alta)	5,6 (alta)	Precoce

*Não solubilizadoras aparentes.

⁽¹⁾Índice de solubilização.

4. Conclusões

As fontes de inóculos utilizadas no experimento com amostras de solo do Município de Presidente Figueiredo não promoveram aumento significativo no rendimento da matéria seca e houve poucos nódulos nas raízes do feijão caupi.

Todos os isolados de rizóbio tiveram bom crescimento em meio com pH 6,5 podendo ser indicados como inoculantes para solos próximos a alcalinidade. No meio com pH 4,5+Al observou-se que 32 isolados cresceram bem e apenas um (01-641) teve baixo crescimento, sendo este último não indicado para sua utilização em solos ácidos com presença de alumínio, solos característicos da região.

O fosfato de cálcio foi solubilizado por 70% dos isolados (7) de rizóbio, porém somente um apresentou alto índice de solubilização (558-2). Nenhum rizóbio solubilizou o fosfato de alumínio.

5. Referências

- Barberi, A.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D. 2004. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, 28(2):397-405.
- Barraqueiro, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R. 1976. Estabelecimento de índices para El estudio de La solubilización de fosfatos por bacterias Del suelo. *Ars. Pharmaceutica*, 17(4):399-406.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazonica*, 34(3):343-357.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(7):667-672.
- Hungria, M.; Campo, R.; Chueire, L.; Grange, L.; Megias, M. 2001. Symbiotic effectiveness of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Biol. Fert. Soils*, 33(5):387-394.
- Jesen, E.S.; Hauggaard-Nielsen, H. 2003. How can increase use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252:177-186.
- Oliveira, L.A. 1988. *Competitive ability of Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli strains*. Thesis Doctor, University of Minnesota. 125p.
- Oliveira, L.A.; Magalhães, H.P. 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Rev. Microbiol.*, 30:203-208.
- Sanginga, N. 2003. Role of biological nitrogen fixation in legume based cropping systems; a case study of West Africa farming systems. *Plant and soil*, 252:25-39.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319.
- Stamford, N.P.; Vasconcelos, I.; Almeida, R.T. 1988. Fixação biológica de nitrogênio em caupi na região nordeste brasileira. In: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (Eds.). O caupi no Brasil: Brasília: IITAS/Embrapa, p. 478-504.
- Toro, M.; Azcón, R.; Herrera, R. 1996. Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biol. Fert. Soils*, 21:23-29.