

Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia

Aloisio Freitas Chagas Junior^{1*}, Luiz Antonio de Oliveira², Arlem Nascimento de Oliveira³ e André Luiz Willerding⁴

¹Universidade Federal do Tocantins, Rua Badeijós, Lote 7, Chácara 69/72, 77402-970, Gurupi, Tocantins, Brasil. ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil. ³Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas, Departamento de Ciências Agronômicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil. ⁴Centro de Biotecnologia da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: chagasjraf@bol.com.br

RESUMO. Em solos com baixa disponibilidade de fósforo, como os de terra firme da Amazônia, a habilidade de estirpes de rizóbio de solubilizar compostos de fosfato inorgânico é extremamente importante. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e fosfato de alumínio (P-Al) de isolados de rizóbio de solos na Amazônia em laboratório e a eficiência simbiótica dos isolados em aumentar os conteúdos de N e P em caupi. Os isolados de rizóbio foram avaliados em meios específicos para solubilização desses fosfatos por um período de 15 dias, obtendo-se os seus índices de solubilização (I.S.). Dos 205 isolados avaliados, 68 solubilizaram P-Ca, 47 solubilizaram P-Al e 32 solubilizaram tanto P-Ca quanto P-Al. Entre 14 isolados solubilizadores testados, 8 (INPA R820, INPA R825, INPA R843, INPA R894, INPA R914, INPA R917, INPA R969 e INPA R982) proporcionaram maiores teores de P na parte aérea, conseqüentemente melhor eficiência na utilização de P e N pelas plantas assim como maior matéria seca da parte aérea.

Palavras-chave: fósforo, Amazônia, ecologia microbiana.

ABSTRACT. Phosphate solubilizing ability and symbiotic efficiency of isolated rhizobia from Amazonian soils. On soils with low available phosphorus, such as the Amazonian upland, the ability of rhizobium strains to solubilize inorganic phosphates is of extreme importance. The objective of this work was to determine the ability of rhizobium isolates from Amazonian soil to solubilize calcium and aluminum phosphate in laboratory, and their symbiotic efficiency to increase N and P contents in cowpea. The rhizobium isolates were evaluated on specific growth media during a period of 15 days, when solubilizing indexes (S.I.) were obtained. From the 205 isolates, 68 solubilized P-Ca and 47 solubilized P-Al, and 32 solubilized P-Ca as well as P-Al. Among the 14 isolates with highest solubilizing activities, eight isolates (INPA R820, INPA R825, INPA R843, INPA R894, INPA R914, INPA R917, INPA R969 and INPA R982) provided higher shoot P and N contents and dry matter.

Key words: phosphorus, Amazon, microbial ecology.

Introdução

O fósforo (P) é o nutriente cuja reduzida disponibilidade limita o crescimento das plantas, apesar de estar presente nos solos tanto nas formas orgânicas como inorgânicas, sendo fundamental no metabolismo de plantas e microrganismos (SMITH, 2002; MARTINAZZO et al., 2007; RHEINHEIMER et al., 2008). Entretanto, em muitos solos do mundo, bem como nas principais classes de solos da Amazônia, há deficiência de P na forma disponível para as plantas. A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade. Nos solos

ácidos, os fosfatos predominantes são os formados pela associação de P com Fe e/ou Al, enquanto nos solos com pH mais elevado predominam as formas associadas ao Ca (BARROSO; NAHAS, 2005).

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre estes processos, destaca-se a dissolução das formas pouco solúveis de P, tornando-as disponíveis para as plantas (RICHARDSON, 2001; SOUCHIE et al., 2007). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (SOUCHIE et al., 2005; 2006;

BARROSO; NAHAS, 2008). O ácido orgânico identificado em estirpes com habilidade de solubilização de fosfato foi o ácido 2-cetogluconico, presente em *Rhizobium leguminosarum* e em *Rhizobium meliloti* (IGUAL et al., 2001). Muitos microrganismos solubilizadores de fosfatos têm sido estudados em função de sua habilidade em solubilizar complexos de P-Ca *in vitro*, e o complexo de P-Ca pode ser solubilizado pela redução no pH (GYANESHWAR et al., 2002).

A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos no solo tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou se diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003).

O uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos, como rizóbio, pode ajudar a aumentar a disponibilidade de P para favorecer o crescimento de plantas leguminosas e não-leguminosas (VESSEY, 2003). Em adição, estirpes de rizóbio, envolvidas na solubilização de P, podem aumentar o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio.

A detecção visual e a estimativa quantitativa e comparativa, por meio do índice de solubilização, da habilidade de estirpes de rizóbio em solubilizar fosfatos pouco solúveis, têm sido possível, utilizando-se experimentos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores. Já a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos tem sido sugerida como forma de se substituir ou se diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis, para incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição das plantas com fósforo (PEIX et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e classificar *in vitro* a capacidade de isolados de rizóbio de solos da Amazônia na solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio e a eficiência simbiótica de isolados selecionados e inoculados em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp).

Material e métodos

Amostras de solos foram obtidas nas regiões do Ramal do Brasileiro (Manaus), Rio Preto da Eva, Careiro da Várzea, Manacapuru, Novo Airão e Barreirinha, todos situados no Estado do Amazonas. As amostras serviram de fonte de inóculo em sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

como planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulos, em ensaio realizado em casa-de-vegetação na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Após a coleta dos nódulos, foram obtidos 205 isolados de rizóbio, usando-se a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970). Os isolados foram repicados em placas de Petri, contendo meio de cultura YMA (Yeast Mannitol Agar) com pH 5,5 e incubados a 28°C por cinco dias, para posteriores testes de solubilização de fosfatos e inoculação.

Para os ensaios em laboratório quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, foram utilizados dois meios de cultura específicos para bactérias solubilizadoras. Um para se verificar a solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca), meio GL, que continha 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar. A este meio foram adicionadas uma solução contendo 0,25 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e outra contendo 1 g L⁻¹ de CaCl₂, ajustando-se o pH para 6,5, com o intuito de se formar fosfato de cálcio precipitado (HARA; OLIVEIRA, 2004).

O meio GL foi modificado por Hara e Oliveira (2004) para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al). Este meio continha 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de K₂HPO₄ e 18 g de ágar. A este meio foi acrescentada, também, uma solução contendo 5,34 g de AlCl₃ e o pH foi ajustado para 4,5 para formar o precipitado de fosfato de alumínio. A modificação do meio GL foi a fonte de açúcar e a utilização e quantidade de AlCl₃ e K₂HPO₄, para que houvesse aproximadamente 1,4 cmol_c de Al no meio, concentração deste elemento encontrada nas principais classes de solos da Amazônia, servindo, assim, como parâmetro para as condições reais desse elemento na natureza.

Com o objetivo de se visualizar a alteração do pH do meio de cultura pelas bactérias, foi acrescentado o indicador verde de bromocresol, no meio P-Al e o azul de bromotimol, no meio P-Ca.

Os isolados de rizóbio foram crescidos em meio YMA (pH 5,5) e foram repicados para cada meio de cultura, estabelecendo-se cinco colônias por placa com duas placas por isolado.

Os isolados foram avaliados por um período de 15 dias. As medidas do diâmetro (ϕ) dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e as do ϕ das colônias foram mensuradas a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado por meio da fórmula: IS = ϕ Halo (mm) / ϕ Colônia (mm) (HARA; OLIVEIRA, 2004).

Com base nos índices de solubilização, 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, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia; tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e 'não-solubilizadoras aparentes', aquelas que não apresentaram solubilização visível até o 15º dia de avaliação (HARA; OLIVEIRA, 2004).

Foram selecionados 17 isolados de rizóbio, sendo 12 positivos para a solubilização em meio de cultura com I.S. final superior a 2, sendo 8 isolados em P-Ca (INPA R813, INPA R820, INPA R839, INPA R843, INPA R894, INPA R969, INPA R982 e INPA R983), 2, em P-Al (INPA R914 e INPA R917) e 2, em ambos os fosfatos (INPA R825 e INPA R841) (Tabela 1). Dois isolados apresentaram I.S. final inferior a 2 (INPA R851 e INPA R918) e outros três isolados (INPA R927, INPA R949 e INPA R993), que não apresentaram solubilização em meio de cultura, foram utilizados como controle negativo. O experimento foi realizado em casa-de-vegetação no INPA, onde os isolados selecionados foram testados em vasos plásticos com capacidade para 1 kg, com solo coletado no Ramal do Brasileirinho, Manaus, Estado do Amazonas (pH 4,1 em H_2O ; pH 3,7 em KCl; 3,0 $mg\ kg^{-1}$ de P; 0,12 $cmol_c\ kg^{-1}$ de K; 0,12 $cmol_c\ kg^{-1}$ de Ca; 0,06 $cmol_c\ kg^{-1}$ de Mg; 2,5 $cmol_c\ kg^{-1}$ de Al + H; 124 $mg\ kg^{-1}$ de Fe; 2,7 $mg\ kg^{-1}$ de Zn; 0,8 $mg\ kg^{-1}$ de Mn).

Neste experimento, o solo foi adubado com fosfato de Araxá ($100\ mg\ kg^{-1}\ P_2O_5$), KCl ($80\ kg\ K\ ha^{-1}$) e sulfatos de cálcio ($5\ cmol_c\ kg^{-1}$) e magnésio ($3\ cmol_c\ kg^{-1}$). No fosfato, os teores de P_2O_5 total e solúvel em ácido cítrico (2%) foram 9,4 e 4,3%, respectivamente. Foram utilizados 19 tratamentos, sendo 17 isolados e dois controles (adubação com N, e testemunha sem adubação com N). O nitrogênio foi aplicado na forma de ureia ($100\ kg\ ha^{-1}$) em três parcelas, a cada 15 dias. Foi utilizado como planta-teste o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) cv. IPEAN V69.

As plantas foram colhidas aos 45 dias de crescimento, determinando-se a produção de matéria seca e o número de nódulos. Foi analisado o teor de fósforo (P) e nitrogênio (N) na parte aérea (EMBRAPA, 1997). O N acumulado (ANPA) na matéria seca da parte aérea (MSPA) foi calculado, multiplicando-se o peso pelo teor de N.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada, segundo a fórmula: $ER = (MSPA\ inoculada / MSPA\ com\ N) \times 100$, em que MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da

parte aérea da planta com N mineral (LIMA et al., 2005). A eficiência simbiótica foi calculada por meio da fórmula: $ES = [(N_{total\ fixado} - N_{total\ TS/N}) / (N_{total\ TC/N} - N_{total\ TS/N}) \times 100]$, em que $N_{total\ fixado}$ = Nitrogênio total do tratamento; $N_{total\ TS/N}$ = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio; $N_{total\ TC/N}$ = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada.

A eficiência da utilização de P nas plantas de caupi foi calculada pela seguinte fórmula (RODRIGUES et al., 2003): $EFU-P = [(matéria\ seca)^2 / (Teor\ do\ nutriente)]$.

Foi determinada a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nas raízes das plantas em estudo, usando-se metodologia descrita por Schenk (1982). Não houve inoculação com FMA, levando-se em consideração que no solo utilizado já existiam esses fungos.

Os isolados utilizados, após crescimento em meio YMA por cinco dias, foram suspensos individualmente em solução salina (0,2% $MgSO_4$) e cada uma dessas suspensões (de 10^8 células por mL) foi adicionada às sementes. Foram semeadas dez sementes por vaso e, após uma semana, foi realizado o desbaste, deixando-se três plantas por vaso, totalizando-se nove plantas por tratamento.

O delineamento experimental para os ensaios em laboratório e casa-de-vegetação foi o inteiramente casualizado. Para os ensaios em meio de cultura, foi realizada a análise estatística somente para o índice de solubilização final. Os dados foram submetidos à análise de variância com teste F, e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa ASSISTAT 7.4.

Resultados e discussão

Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos em meio de cultura, a Tabela 1 apresenta os 68 isolados (33,2%), dos 205 estudados, que solubilizaram o P-Ca, e que apenas o isolado INPA R813 apresentou alto índice de solubilização final (I.S. = 3,15) significativamente superior ($p < 0,001$) aos outros isolados, aos 15 dias de avaliação. Nove apresentaram índice de solubilização médio, variando de 2,06 a 2,57 (Figura 1). Dentre os isolados capazes de solubilizar o P-Ca, 35 (51,5%) se comportaram como precoces e 33 (48,5%), como tardios. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente no período de 15 dias de avaliação. Verificou-se que, dos isolados com capacidade de solubilizar P-Ca, 65 (95,6%) diminuíram o pH do meio, e somente três (4,4%) não alteraram a coloração (Tabela 1).

Estudos evidenciam que a capacidade dos isolados de rizóbio em solubilizar o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio decorrente da formação de ácidos orgânicos (MIKANOVÁ; NOVÁKOVÁ, 2002; HARA; OLIVEIRA, 2005). Os ácidos orgânicos secretados podem dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de anions PO_4^{3-} ou podem quelatizar íons de $\text{Fe}^{2+/3+}$ e Al^{3+} associados com fosfatos.

Quanto à solubilização de P-Al, dos 205 isolados estudados, 47 (22,9%) apresentaram a capacidade de solubilização (Tabela 1). Somente quatro destes isolados apresentaram índice de solubilização médio após 15 dias de avaliação, variando de 2,07 a 2,41, significativamente superiores ($p < 0,001$) aos outros isolados (Figura 1). Entre os solubilizadores, 14 (29,8%) comportaram-se como precoces e 33 (70,2%), como tardios, solubilizando o fosfato depois do 6º, 9º, 12º e 15º dia. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente em meio com P-Al. Dos isolados com capacidade de solubilizar P-Al, 21 (44,7%) diminuíram o pH do meio, 8 (17%) alcalinizaram e 18 (38,3%) não o alteraram (Tabela 1). Ilmer et al. (1995) citam que a produção de ácidos orgânicos por microrganismos e a liberação de íons H^+ são importantes mecanismos para se solubilizar o AlPO_4 . Após a solubilização, o alumínio é liberado para o meio na forma monomérica (Al^{3+}), o que poderia causar toxicidade aos isolados. No entanto, o fósforo oriundo da solubilização do AlPO_4 é suficiente para suprimir um incremento no efeito tóxico do alumínio decorrente da solubilização (ILLMER et al., 1995).

A maioria dos isolados estudados reduziu o pH do meio e solubilizou os fosfatos. Assim, a produção de ácidos orgânicos é um importante mecanismo para solubilização, mas não o único possível já que parte dos isolados alcalinizou o meio ou não alterou o pH (Tabela 1).

Os dados da Tabela 1 indicam que 43 (63%) dos isolados que solubilizaram o P-Ca também solubilizaram o P-Al, confirmando os resultados obtidos por Hara e Oliveira (2004) que observaram esse comportamento em 76,5% dos isolados testados. Porém, Silva Filho e Vidor (2000) identificaram 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. Essa sequência no processo de isolamento poderia levar à maior seletividade de microrganismos capazes de solubilizar P-Ca em detrimento de P-Al.

Resultados semelhantes, quanto à capacidade de solubilizar fosfatos, foram reportados por Mikanová e Nováková (2002), nos quais os isolados de rizóbio estudados foram efetivos quanto à solubilização de P-Ca em laboratório, mas a eficiência de solubilização variou entre as estirpes.

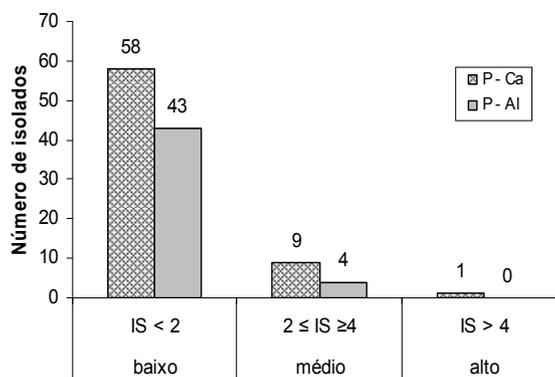


Figura 1. Histograma de classes de índices de solubilização apresentados pelos isolados testados em 15 dias.

Os resultados do Experimento 2, com adubação de fosfato de rocha e inoculação dos isolados selecionados, encontram-se na Tabela 2. Todos os isolados inoculados em feijão caupi aumentaram significativamente ($p < 0,001$) o crescimento das plantas em relação à testemunha. Entre estes, INPA R820, INPA R825, INPA R843, INPA R894, INPA R914, INPA R917, INPA R969 e INPA R982 proporcionaram as maiores produções de matéria seca da parte aérea (MSPA) e total (MST), porém sem diferirem significativamente do tratamento-controle adubado com nitrogênio. Estes isolados também apresentaram número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) significativamente superiores aos outros isolados ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Quanto à matéria seca da raiz (MSR), destaque para os tratamentos com os isolados INPA R825, INPA R894 e o tratamento adubado com N.

Os isolados que proporcionaram aumentos significativos para MSPA das plantas contribuíram para a eficiência relativa (ER) significativamente superior ($p < 0,001$) em relação aos demais isolados avaliados, porém similares ao tratamento adubado com ureia (Tabela 2). O mesmo foi observado para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) ($p < 0,01$). Esses isolados também proporcionaram os maiores valores de eficiência simbiótica (ES), com percentuais acima de 70% (Figura 2).

Os maiores teores de P, na parte aérea das plantas, também foram obtidos com a inoculação dos isolados INPA R820, INPA R825, INPA R843, INPA R894, INPA R914, INPA R917, INPA R969 e INPA R982.

Tabela 1. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e alumínio de 68 isolados de rizóbio dos 205 estudados.

Isolados	P – Ca					P – Al				
	Início Solubilização ⁽¹⁾ (dia)	I.S. ⁽²⁾		Solubilização	pH do Meio	Início Solubilização	I.S.		Solubilização	pH
		Inicial	Final ⁽³⁾				Inicial	Final ⁽³⁾		
INPA R806	6	1,16	1,84 fgh	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R808	6	1,10	1,38 p	Tardio	Não alterou	3	1,09	1,28 ip	Precoce	Alcalinizou
INPA R809	3	1,17	1,35 p	Precoce	Acidificou	9	1,02	1,03 p	Tardio	Alcalinizou
INPA R812	-	-	-	-	-	15	1,06	1,06 p	Tardio	Alcalinizou
INPA R813	3	1,52	3,15 a	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R814	15	1,12	1,12 p	Tardio	Acidificou	3	1,06	1,06 p	Precoce	Não alterou
INPA R815	12	1,08	1,08 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R816	3	1,23	1,28 p	Precoce	Acidificou	9	0,99	1,00 p	Tardio	Acidificou
INPA R817	3	1,16	1,16 p	Precoce	Acidificou	3	1,00	1,00 p	Precoce	Acidificou
INPA R819	15	0,29	0,38 q	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R820	3	1,20	2,31 bc	Precoce	Acidificou	15	1,05	1,05p	Tardio	Não alterou
INPA R822	9	1,23	1,23 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R824	6	1,10	1,23 p	Tardio	Acidificou	12	1,09	1,09 p	Tardio	Acidificou
INPA R825	3	1,49	2,22 bcde	Precoce	Acidificou	3	1,06	2,41 a	Precoce	Acidificou
INPA R829	12	1,09	1,09 p	Tardio	Acidificou	3	1,00	1,00 p	Precoce	Alcalinizou
INPA R830	-	-	-	-	-	9	1,00	1,00 p	Tardio	Não alterou
INPA R832	3	1,27	1,91 defg	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R836	6	0,76	0,93 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R839	3	1,47	2,57 b	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R841	3	1,26	2,06 cdef	Precoce	Acidificou	9	1,35	2,07 bc	Tardio	Acidificou
INPA R843	3	1,41	2,10 cdef	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R851	3	1,40	1,51 him	Precoce	Acidificou	9	1,09	1,09 p	Tardio	Alcalinizou
INPA R852	6	1,19	1,27 p	Tardio	Acidificou	9	1,27	1,47 fghij	Tardio	Não alterou
INPA R869	3	1,23	1,93 defg	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R871	6	0,20	1,33 p	Tardio	Acidificou	6	1,19	1,97 bcd	Tardio	Acidificou
INPA R892	3	1,13	1,13 p	Precoce	Acidificou	9	1,04	1,07 p	Tardio	Acidificou
INPA R894	6	1,07	2,36 bc	Tardio	Não alterou	-	-	-	-	-
INPA R896	9	1,25	1,46 o	Tardio	Não alterou	-	-	-	-	-
INPA R898	3	1,18	1,31 p	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R906	3	1,12	1,12 p	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R908	6	0,26	0,66 q	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R910	15	0,75	0,75 q	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R911	3	1,21	1,25 p	Precoce	Acidificou	3	1,00	1,23 p	Precoce	Acidificou
INPA R914	6	1,17	1,35 p	Tardio	Acidificou	3	1,00	2,36 a	Precoce	Não alterou
INPA R915	3	1,21	1,83 fghi	Precoce	Acidificou	12	1,16	1,29 hip	Tardio	Não alterou
INPA R917	6	1,16	1,22 p	Tardio	Acidificou	6	1,52	2,24 ab	Tardio	Acidificou
INPA R918	12	1,02	1,10 p	Tardio	Acidificou	15	1,06	1,06 p	Tardio	Alcalinizou
INPA R920	3	1,17	1,17 p	Precoce	Acidificou	3	1,00	1,20 p	Precoce	Não alterou
INPA R922	3	1,24	1,35 p	Precoce	Acidificou	6	1,11	1,57 efgh	Tardio	Acidificou
INPA R925	3	1,13	1,47 in	Precoce	Acidificou	6	1,08	1,21 p	Tardio	Acidificou
INPA R930	9	1,11	1,14 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R933	3	1,00	1,25 p	Precoce	Acidificou	6	1,00	1,46 fghil	Tardio	Acidificou
INPA R936	15	0,25	0,25 q	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R937	-	-	-	-	-	6	1,11	1,61 efg	Tardio	Não alterou
INPA R939	3	1,14	1,61 ghil	Precoce	Acidificou	12	1,11	1,31 hio	Tardio	Não alterou
INPA R941	-	-	-	-	-	6	1,09	1,39 ghim	Tardio	Acidificou
INPA R942	6	0,48	0,71 q	Tardio	Acidificou	9	1,18	1,23 p	Tardio	Acidificou
INPA R943	6	1,18	1,89 efg	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R947	3	1,29	1,42 p	Precoce	Acidificou	9	1,21	1,79 cde	Tardio	Não alterou
INPA R951	6	1,18	1,23 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R955	12	0,62	0,90	Tardio	Acidificou	12	1,01	1,01 p	Tardio	Não alterou
INPA R957	3	1,12	1,41 p	Precoce	Acidificou	6	1,00	1,82 def	Tardio	Não alterou
INPA R963	9	1,39	1,39 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R964	6	1,21	1,29 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R965	12	1,12	1,12 p	Tardio	Acidificou	9	1,00	1,07 p	Tardio	Acidificou
INPA R966	3	1,00	1,13 p	Precoce	Acidificou	9	1,11	1,27 ip	Tardio	Acidificou
INPA R968	6	1,00	1,16 p	Tardio	Acidificou	9	1,23	1,33 hin	Tardio	Acidificou
INPA R969	3	1,13	2,26 bed	Precoce	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R972	6	1,22	1,35 p	Tardio	Acidificou	12	1,05	1,05 p	Tardio	Acidificou
INPA R973	3	1,09	1,12 p	Precoce	Acidificou	3	1,08	1,18 p	Precoce	Acidificou
INPA R977	6	1,04	1,09 p	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R978	3	1,32	1,84 fgh	Precoce	Acidificou	12	1,22	1,43 ghim	Tardio	Acidificou
INPA R980	3	1,00	1,10 p	Precoce	Acidificou	3	1,00	1,69 efgh	Precoce	Alcalinizou
INPA R982	3	1,14	2,24 bcde	Precoce	Acidificou	12	1,09	1,16 p	Tardio	Acidificou
INPA R983	6	1,24	2,11 cdef	Tardio	Acidificou	-	-	-	-	-
INPA R990	3	1,28	1,40 p	Precoce	Acidificou	3	1,00	1,08 p	Precoce	Não alterou
INPA R992	3	1,23	1,43 p	Precoce	Acidificou	3	1,23	1,25 ip	Precoce	Não alterou
INPA R994	3	1,19	1,25 p	Precoce	Acidificou	3	1,19	1,25 ip	Precoce	Alcalinizou
INPA R999	6	1,14	1,28 p	Tardio	Acidificou	6	1,14	1,64 efg	Tardio	Não alterou
INPA R1004	3	1,24	1,67 ghij	Precoce	Acidificou	3	1,08	1,08 p	Precoce	Não alterou
INPA R1008	3	1,00	1,44 p	Precoce	Acidificou	6	1,26	1,57 efgh	Tardio	Não alterou
INPA R1009	6	1,00	1,06 p	Tardio	Acidificou	12	1,09	1,09 p	Tardio	Não alterou

¹Início de solubilização. ²Índice de Solubilização. ³Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%. Não solubilizou.

Neste estudo, os teores de P na parte aérea das plantas inoculadas com estes isolados estão dentro do nível adequado para a cultura do feijão caupi, que varia entre 1,2 e 1,5 g kg⁻¹ (MALAVOLTA et al., 1997). Em consequência, a EFU-P também foi significativamente maior com a utilização desses isolados (Tabela 2). Estes resultados indicam a importância não somente da adubação do fosfato de rocha, mas também do rizóbio na disponibilidade de P às plantas. Isto decorre da capacidade das bactérias em solubilizar fosfatos de baixa solubilidade, como é o caso do fosfato de rocha.

Em todos os tratamentos foi observada a ocorrência de FMA (Tabela 2). Provavelmente, os isolados solubilizaram este fosfato, tornando o fósforo disponível na solução do solo. Isto favoreceu sua absorção por FMA, resultando em aumento no crescimento das plantas. O baixo teor de P na parte aérea, quando inoculado com o isolado INPA R813 (Tabela 2), indica que a solubilização não ocorreu ou houve baixa solubilização, assim como os isolados com baixo índice de solubilização (INPA R851 e INPA R918) ou não-solubilizadores aparentes (INPA R927, INPA R949 e INPA R993), ou que o sinergismo entre FMA e rizóbio não ocorreu. Abd-Alla e Omar (2001) e Souchie et al. (2006) têm descrito interações sinérgicas ou antagônicas entre FMA e bactérias solubilizadoras de fosfato.

Peix et al. (2001) verificaram aumento na produtividade de ervilha, soja e feijão, respectivamente, quando inoculados com rizóbios solubilizadores de fosfatos. Porém, é conhecido que todos os aspectos do processo de formação de nódulo que fixa N₂ estão limitados por disponibilidade de P. Assim, podemos inferir que os tratamentos com isolados com

capacidade de solubilização de fosfatos em meio de cultura e que apresentaram teores de P na parte aérea e EFU-P significativamente superiores aos outros isolados, podem ter influenciado positivamente na capacidade de nodulação e, em consequência, na eficiência simbiótica (Tabela 2, Figura 2). Peix et al. (2001) reportam, também, que bactérias envolvidas na solubilização de fosfato aumentam o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio.

Como há indicativo de sua capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis e de promover o crescimento das plantas de feijão caupi, como relatado anteriormente, estes isolados selecionados são de grande interesse para estudos posteriores de inoculação em feijão caupi em condições de campo, enfocando testes agrônomicos e os mecanismos de sobrevivência em solos da região amazônica. Assim, será possível selecionar isolados que possam solubilizar o fósforo insolúvel, além evidentemente de fixar o N atmosférico.

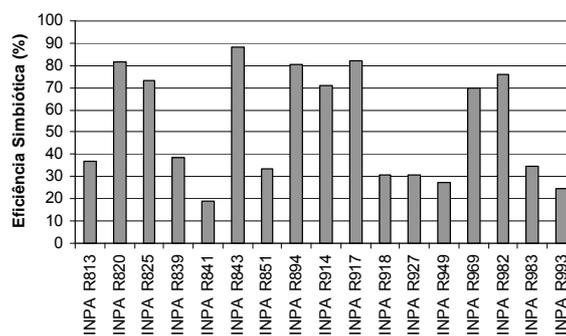


Figura 2. Índice de eficiência simbiótica dos tratamentos inoculados com isolados de rizóbio, em relação ao N total acumulado em feijão caupi, 45 dias após o plantio.

Tabela 2. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), eficiência relativa (ER), acúmulo de N na parte aérea (ANPA), fósforo na parte aérea (Teor de P), eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) e ocorrência de fungo micorrízico arbusculares (FMA) em feijão caupi inoculado com rizóbio¹.

Isolados	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN ⁽⁴⁾	MSN (mg vaso ⁻¹)	ER (%)	ANPA (mg)	Teor P (g kg ⁻¹)	EFU-P ⁽⁵⁾	FMA ⁽⁶⁾
INPA R813	2,08 def	0,50 cdef	2,58 cde	16 c	76 efg	61 efg	63,9 ef	1,07 de	6,41 de	+
INPA R820	3,37 a	0,50 cdef	3,87 a	55 a	286 abc	98 a	120,3 b	1,17 bc	12,86 a	+
INPA R825	2,90 bc	0,80 ab	3,70 a	42 a	232 bcd	85 abc	109,9 cd	1,49 ab	9,32 abc	+
INPA R839	2,18 de	0,40 def	2,58 cde	9 c	50 hi	64 efg	66,1 ef	1,0 e	6,82 d	+
INPA R841	1,70 efg	0,50 cdef	2,20 def	18 bc	65 efg	50 hi	41,7 gh	1,04 d	4,67 ef	+
INPA R843	3,40 a	0,59 cde	3,99 a	41 ab	222 bcd	99 a	128,9 b	1,25 bc	12,81 a	+
INPA R851	2,10 de	0,40 def	2,50 cde	10 c	49 hi	61 fgh	59,9 efg	1,01 e	6,19 de	+
INPA R894	3,21 ab	0,68 ab	3,89 a	46 a	270 abc	94 ab	118,5 bc	1,58 a	9,59 abc	+
INPA R914	3,08 abc	0,55 cde	3,63 ab	55 a	340 a	90 abc	107,2 cd	1,63 a	8,26 abc	+
INPA R917	3,25 ab	0,55 cde	3,80 a	46 a	229 bcd	95 ab	121,2 b	1,42 abc	10,22 abc	+
INPA R918	2,00 efg	0,30 efg	2,30 def	16 c	86 efg	58 efg	56,2 fg	0,93 ef	5,51 de	+
INPA R927 NS ⁽²⁾	2,30 de	0,40 def	2,70 cd	11 c	34 i	67 def	56,1 fg	0,96 ef	7,59 d	+
INPA R949 NS	2,20 de	0,40 def	2,60 cde	9 c	27 i	64 efg	52,1 fgh	1,05 e	6,44 de	+
INPA R969	3,00 abc	0,55 cde	3,55 ab	43 a	228 bcd	87 abc	105,5 cd	1,48 ab	8,60 abc	+
INPA R982	3,14 ab	0,60 cde	3,74 a	45 a	219 bcd	92 ab	113,4 cd	1,44 abc	9,79 abc	+
INPA R983	2,40 d	0,41 def	2,81 cd	14 c	73 efg	70 def	61 efg	1,12 de	7,29 d	+
INPA R993 NS	2,00 efg	0,30 efg	2,30 def	9 c	40 hi	58 fgh	48,8 gh	0,98 ef	5,40 de	+
Testemunha sem N	0,72 h	0,32 efg	1,04 g	0 d	0 j	21 j	17,6 i	0,67 f	1,66 g	+
Adubado com N	3,43 a	0,90 a	4,33 a	0 d	0 j	100 a	143,4 a	1,65 a	11,50 ab	+
C.V. ⁽³⁾	13,5	8,4	8,4	14,2	26,3	20,5	8,5	8,5	19,4	

¹Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ²NS = não-solubilização aparente. ³Coefficiente de variação. ⁴Dados transformados por raiz de X + 0,5. ⁵EFU-P = [(g MS) / Teor de P]. ⁶+, positivo para ocorrência de FMA.

Conclusão

Entre os rizóbios isolados de solos da Amazônia avaliados, 56% apresentaram capacidade para solubilização de fosfatos em meio de cultura, predominando baixos índices de solubilização.

Os isolados INPA R820, INPA R825, INPA R843, INPA R894, INPA R914, INPA R917, INPA R969 e INPA R982 proporcionaram maiores teores de P na parte aérea, resultando em melhor eficiência na utilização de P (EFU-P) e eficiência simbiótica pelas plantas.

Agradecimentos

À Capes pela concessão de Bolsa, UFAM e INPA, aos colaboradores na pesquisa e à Fapeam e CNPq, pelos recursos financeiros que viabilizaram esta pesquisa.

Referências

ABD-ALLA, M. H.; OMAR, S. A. Survival of rhizobia/bradyrhizobia and rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agro-industrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 261-272, 2001.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Londrina: Embrapa/CNPq, 1997.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 265-270, 1995.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, M. F. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e a aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997.

MARTINAZZO, R.; SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano no solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 563-570, 2007.

MIKANOVÁ, O.; NOVÁKOVÁ, J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. **Rostlinná Výroba**, v. 48, n. 9, p. 397-400, 2002.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 103-110, 2001.

RHEINHEIMER, D. S.; MARTINAZZO, R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; SILVA, L. S. Amplitude no fósforo microbiano em um Argissolo em pastagem nativa submetida à roçada e à introdução de espécies forrageiras com fertilização fosfatada em diferentes épocas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 561-567, 2008.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 8, p. 897-906, 2001.

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A.; SALOMÃO, M. S. M. B. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. II- Absorção e eficiência de utilização de fósforo e frações fosfatadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 4, p. 593-599, 2003.

SCHENK, N. C. **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microorganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 6, p. 311-319, 2000.

SMITH, F.W. The phosphate uptake mechanism. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 105-114, 2002.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilizadores de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, 2006.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VINCENT, J. M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scient, 1970. (IBP Handbook, n. 15).

Received on April 30, 2008.

Accepted on November 12, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.