

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ECOLÓGICAS DE ISOLADOS DE RIZÓBIO ORIUNDOS DE SOLOS ÁCIDOS DO MUNICÍPIO DO RIO PRETO DA EVA, AMAZONAS¹

Francisco Adilson dos Santos HARA²
Luiz Antônio de OLIVEIRA³

RESUMO: Alguns isolados de rizóbio, além de fixarem o N₂, são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis, disponibilizando o P para as plantas e para si mesmos. No entanto, o Al e a acidez dos solos da Amazônia podem diminuir a população desses microrganismos. O presente trabalho avaliou a capacidade nodulífera, a tolerância à acidez e ao Al tóxico, bem como a capacidade de solubilizar fosfatos de Ca e de Al de 35 isolados de rizóbio de solos agrícolas, do município de Rio Preto da Eva, AM. Amostras de solo sob cultivos agrícolas foram coletadas e utilizadas como fontes de inóculo para plantas de feijão caupi. Os inóculos INPA-RP7, INPA-RP10, INPA-RP9, INPA-RP8, INPA-RP1 e INPA-RP3 proporcionaram rendimento de massa seca da parte aérea e dos nódulos superior à testemunha. A maioria dos isolados (92%) apresentou tolerância à acidez, e o alumínio foi o fator mais limitante, pois apenas 8% dos isolados apresentaram tolerância ao alumínio tóxico num período de 18 dias de avaliação. A nodulação foi fundamental para o rendimento de massa seca das plantas de caupi, sendo que a mesma se correlacionou principalmente com a massa seca dos nódulos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Fixação Biológica do Nitrogênio, Rizóbio, Acidez, Alumínio e Solubilização de Fosfato.

PHYSIOLOGICAL AND ECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RHIZOBIA ISOLATES FROM ACID SOILS OF THE RIO PRETO DA EVA MUNICIPALITY, AMAZON

ABSTRACT: Some isolated rhizobias, besides fixing N₂, are also able to dissolve phosphates of low solubility, making the P available both for plants and for themselves. Some factors such as toxic Al and acidity, as in some Amazonian soils, may decrease the population of these microorganisms.

¹ Aprovado para publicação em 24.07.07

² Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Agrícola e Solos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas. E-mail: fhara@ufam.edu.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Coordenação de Pesquisa em Ciências Agronômicas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

The present study evaluated the nodulation ability, tolerance to acidity and toxic aluminium of rhizobia isolated from agricultural soils from the municipality of Rio Preto da Eva, AM. Samples of soil under agricultural cultivation were collected and used as a source of inoculum for the cowpea bean. The inoculum INPA-RP7, INPA-RP10, INPA-RP9, INPA-RP8, INPA-RP1 and INPA-RP3 promoted an increase of aerial biomass and nodules when compared to the absence of inoculum. Most isolated rhizobias (92%) presented tolerance to acidity in a period of 18 days. The aluminium was the major limiting factor, since only 8% of the isolated rhizobias presented tolerance to toxic aluminium. The nodulation was important for the dry mass of the caupi plants, and the same was correlated to the dry mass nodules.

INDEX TERMS: Nitrogen Biological Fixation, Rhizobium, Acidity, Aluminium and Phosphate Solubilizing.

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos solos da região amazônica são ácidos, com alta concentração de alumínio e de baixa fertilidade, são deficientes em N e P (NICHOLAIDES et al., 1983), dois elementos essenciais para as plantas e de difícil aplicação como fertilizantes pelos pequenos agricultores.

A utilização da simbiose leguminosa-rizóbio é uma alternativa promissora para a agricultura de baixos insumos nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente para a região amazônica, onde a utilização de fertilizantes nitrogenados e fosfatados é uma prática onerosa economicamente.

Além da capacidade de fixar o N_2 , alguns isolados de rizóbio são capazes de solubilizar fosfatos insolúveis do solo, disponibilizando o fósforo tanto para si mesmo como para a planta hospedeira, aumentando o crescimento (CHABOT et al., 1998; STARKANOVA; VORISEK; MIKANOVA, 1999). Vários trabalhos têm verificado a habilidade de diferentes microrganismos solubilizar fosfatos de cálcio (P-Ca) (GOLDSTEIN, 1986) e de alumínio (P-Al)

(SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Entre esse grupo, o rizóbio destaca-se como um dos mais eficientes (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Embora a pesquisa tenha mostrado que os rizóbios podem tornar as plantas menos dependentes da aplicação de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, fatores do solo, predominantes na Amazônia, como a acidez (BONETTI; OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1984), e alta concentração de alumínio (JOHNSON; WOOD, 1990; OCTIVE; JOHNSON; WOOD, 1994) podem diminuir a população desses microrganismos no solo. Apesar disso, alguns isolados podem desenvolver mecanismos de tolerância a esses fatores (KAWAI; ZHANG; SUGIMOTO, 2000; WATKIN et al., 2000).

Apesar da importância prática e econômica do uso da associação leguminosa-rizóbio, poucos estudos básicos de como os fatores químicos dos solos afetam a sobrevivência, reprodução e a capacidade infectiva da bactéria, o crescimento da planta e a simbiose de ambos os organismos, foram realizados. Devido à diversidade de espécies, microrganismos e condições regionais, estes

tipos de estudos devem ser intensificados, para que se compreenda melhor essas associações, permitindo que sejam eficazes e auxiliem na viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas e agroflorestais implantados na Amazônia.

A seleção de isolados de rizóbio com boa capacidade infectiva, resistência à acidez e ao alumínio tóxico, e que solubilizem fosfatos inorgânicos é fundamental para a produção e utilização de inoculantes em leguminosas pelos agricultores, nas condições de solos predominantes na Amazônia, objetivando a diminuição da aplicação de fertilizantes.

O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade nodulífera, tolerância à acidez e ao alumínio tóxico, bem como a capacidade de solubilizar o P-Ca e de P-Al, de isolados de populações de rizóbio de solos agrícolas do município do Rio Preto da Eva, Amazonas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE RIZÓBIO EM AMOSTRAS DE SOLOS

Em quatro propriedades rurais do município de Rio Preto da Eva, Amazonas, três áreas com diferentes cultivos agrícolas foram selecionadas e, de cada uma delas, retiraram-se três amostras da camada superficial de um Latossolo Amarelo (0 – 20 cm). Determinou-se o valor de pH do solo de amostras coletadas em diversas culturas dentro de um raio de 1,0 m de distância do tronco (Tabela 1).

De cada amostra, foram retiradas subamostras de 60 g de solo, para serem usadas

como fonte de inóculo para o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp., cultivar IPEAN – V69) e para a avaliação da população de rizóbio em um experimento em casa de vegetação.

As subamostras de solo foram colocadas sobre e no centro da areia estéril (autoclavada a 120°C por duas horas) em vasos esterilizados com capacidade para 3 kg, e sobre elas foram semeadas oito sementes para que, ao germinarem, as raízes das plantas entrassem em contato com rizóbios presentes nos solos. No sétimo dia após a germinação, fez-se um desbaste deixando-se três plantas por vaso. A irrigação foi feita com uma solução nutritiva completa (pH 4,5 + 2 cmol_c AL.L⁻¹) modificada (SPECHT et al., 1956; SMITH; JOHSON; CORNFORTH, 1983), segundo Oliveira e Magalhães (1999), para representar as condições de acidez encontradas na maioria dos solos da Amazônia.

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 13 tratamentos em três repetições, sendo 12 referentes as diferentes áreas de coleta de solo consideradas como fontes de inóculos, mais um tratamento testemunha, com os vasos contendo apenas areia estéril.

Na floração, aproximadamente 45 dias após a germinação, as plantas foram seccionadas na base do caule, e levadas para secar a 60°C até peso constante para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA). Foi também avaliado o número (NN) e a massa dos nódulos secos (MNS).

Foi realizada a análise de variância (1%) e, para as características que tiveram

efeitos significativos, foi realizado o teste de Tukey (1%). Os dados referentes ao número de

nódulos foram transformados em raiz quadrada ($X + 0,5$).

Tabela 1 - Valores de pH (H₂O) das amostras de solo utilizados como fonte de inóculo, com seus respectivos códigos, coletadas nas propriedades rurais do município de Rio Preto da Eva, Amazonas.

Propriedade rural	Cultura *	Código das amostras	pH amostras			
			1	2	3	média
1	Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	INPA-RP1	4,5	4,5	4,5	4,5
	Pupunha (<i>Bactris gasipae</i> HBK)	INPA-RP2	4,5	4,3	4,3	4,4
	Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd.. Ex Spreng) Schum)	INPA-RP3	4,7	4,6	4,7	4,7
	Guaraná (<i>Paulinea cupana</i>)	INPA-RP4	3,7	3,7	3,7	3,7
2	Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	INPA-RP5	4,3	4,3	4,3	4,3
	Abacate (<i>Persea americana</i> L.)	INPA-RP6	4,5	4,5	4,5	4,5
	Limão (<i>C. limon</i> Burn)	INPA-RP7	5,6	5,8	5,5	5,6
3	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i> (Willd.. Ex Spreng) Schum)	INPA-RP8	5,8	5,9	5,8	5,8
	Côco (<i>Cocos nucifera</i> L.)	INPA-RP9	6,3	6,4	6,4	6,4
	Laranja (<i>C. sinensis</i>)	INPA-RP10	4,4	4,8	4,7	4,6
4	Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	INPA-RP11	4,3	4,3	4,2	4,3
	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i> (Willd.. Ex Spreng) Schum)	INPA-RP12	4,4	4,4	4,4	4,4

*Os solos sob os cultivos agrícolas foram todos classificados como Latossolo Amarelo.

2.2 ISOLAMENTO DE RIZÓBIO E TESTE DE TOLERÂNCIA À ACIDEZ E AO ALUMÍNIO TÓXICO

Após o experimento de infectividade e eficiência das populações, foram selecionados das plantas dos respectivos tratamentos, os nódulos ativos e maiores (coloração intensa avermelhada) para obtenção de novos isolados de acordo com Somasegaran e Hobe (1985). Foram obtidos de 3 a 5 nódulos por tratamento e de cada nódulo foi obtido um isolado de rizóbio, que foi repicado, purificado e armazenado em meio YMA (VINCENT, 1970) a temperatura de

28°C. Cada isolado foi inoculado em placas de Petri em meio YMA a pH 6,5, e incubados a temperatura de 28°C durante 10 dias, para depois serem repicados para os meios contendo os tratamentos específicos do experimento.

Os tratamentos utilizados foram meios YMA com pH 4,5; pH 4,5 + 2,0 cmol Al.L⁻¹ e pH 6,5, em quatro repetições. Os valores de pH do meio foram equilibrados nos valores propostos variando apenas nos meios com pH 4,5 as concentrações de Al. Foi acrescentado o corante indicador bromocresol verde nos meios com pH 4,5 e pH 4,5 + Al, e no meio com

pH 6,5 foi acrescentado o azul de bromotimol, para verificar a alteração do pH do meio pelas bactérias. Os isolados foram incubados em câmara de crescimento a 28°C

Para a avaliação da tolerância à acidez e ao alumínio foi utilizado o método de riscagem proposta por Oliveira e Magalhães (1999), que foram feitas a cada três dias durante

um período de 15 dias. De acordo com o crescimento celular nas respectivas zonas (Figura 1) foram dados valores de crescimento para cada isolado, variando de 1 a 4 (Figura 2), podendo ter valores intermediários entre esses extremos. Este método permite ainda selecionar os isolados a partir da escala determinada na Tabela 2 e classificá-los de acordo com o grau de tolerância.

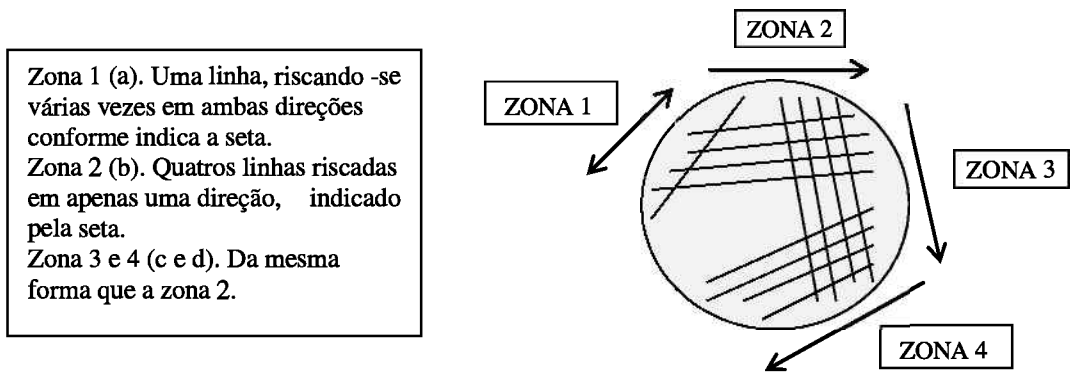


Figura 1 - Ilustração do método de riscagem de bactéria para avaliação da tolerância à acidez e ao alumínio, proposto por Oliveira e Magalhães (1999).

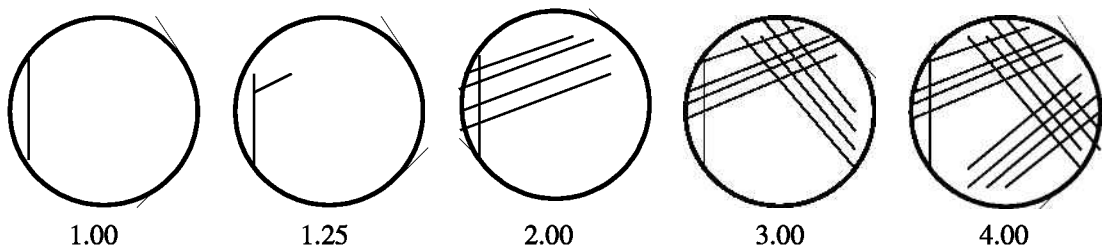


Figura 2 - Escala para avaliação da tolerância à acidez e ao alumínio tóxico de isolados de rizóbio distribuídos em meio de cultura, segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

Tabela 2 - Escala para a avaliação do crescimento de rizóbio no meio YMA (pH 6,5; pH 4,5+Al; pH 4,5) (Oliveira; Magalhães, 1999).

Graus de tolerância	Intervalos de pontuação
Sensível	1,00 - 2,00
Mediano	2,06 * - 3,00
Tolerante	3,06 * - 4,00

* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25

** Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25

2.3 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E DE ALUMÍNIO

Para a avaliação da solubilização de P-Ca foi utilizada um meio de crescimento contendo 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 18 g de ágar mais uma solução A contendo 5 g de K_2HPO_4 e 50 mL de água e uma solução B contendo 10g de $CaCl_2$, para que haja a formação do P-Ca precipitado, com pH corrigido para 6,5. Um segundo meio para verificar a solubilização de P-Al conteve 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de K_2HPO_4 e 18 g de ágar mais uma solução com 5,34 g de $AlCl_3$, para formar o precipitado P-Al, com pH corrigido para 4,5 (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982).

Os isolados de rizóbio, crescidos em meio YMA (pH 6,5), foram repicados para cada meio de solubilização de fosfatos, sendo que isto foi feita de forma tal que ficassem cinco colônias por placas, usando-se duas placas por isolados. A temperatura de incubação de 28 °C.

A avaliação foi realizada durante 18 dias, e a cada três dias mediu-se o diâmetro (Ø) dos halos de solubilização e diâmetro das colônias a cada três dias. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de

solubilização para cada isolado, através da fórmula: $IS = \frac{\text{Ø Halo (mm)}}{\text{Ø Colônia (mm)}}$ (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976).

Baseado nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como de baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS \geq 4$). De acordo com o início da solubilização, os isolados foram classificados como precoce, cujo início da solubilização se deu a partir do terceiro dia; tardia, com início da solubilização depois do terceiro dia e não solubilizadoras aquelas que não apresentaram solubilização até o 15º dia de avaliação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTE DE INFECTIVIDADE EM CONDIÇÃO DE ACIDEZ

Houve efeito significativo das diferentes fontes de inóculo sobre o rendimento de massa seca da parte aérea do caupi (Tabela 3). Os inóculos designados por INPA-RP7, INPA-RP10, INPA-RP9, INPA-RP8 e INPA-RP1 proporcionaram maior massa seca da parte aérea do feijão caupi em relação a testemunha. As demais populações de rizóbio, com exceção do inóculo INPA-RP11, não proporcionaram

rendimento satisfatório de massa seca da parte aérea para o caupi, visto que não diferiram de forma significativa da testemunha.

O inóculo INPA-RP7 proporcionou rendimento de massa seca da parte aérea do caupi cerca de quatro vezes superior à testemunha (Tabela 3). Os inóculos INPA-RP8, INPA-RP9 e INPA-RP10, são oriundos de amostras de solos com valores médios de pH variando entre 4,4 – 6,5 (Tabela 1). Como o pH utilizado no experimento foi de 4,5 pode ser indicativo de que, embora as bactérias existentes nesses inóculos estivessem adaptadas a um pH mais próximo da neutralidade, elas desenvolveram mecanismos de adaptação à acidez. Esse resultado foi confirmado pelo teste de tolerância com estirpes oriundas dos nódulos desse tratamento, pois os isolados INPA-RP8, INPA-RP9 e INPA-RP10 apresentaram, aos 18 dias de avaliação, tolerância média (3,00) a alta (4,00) em relação ao pH 4,5 (Tabela 3). Geralmente, os isolados de solos mais ácidos são mais tolerantes à acidez do que os que não

se encontram nesta condição (CLINE; SENWO, 1994).

Entre os inóculos estudados, o INPA-RP12 foi o menos eficiente em relação ao número de nódulos, embora não diferiu de forma significativa do INPA-RP3, INPA-RP11, INPA-RP5, INPA-RP12 e INPA-RP4 (Tabela 3). Os inóculos INPA-RP1, INPA-RP3, INPA-RP87, INPA-RP8, INPA-RP9 e INPA-RP10 proporcionaram altos valores de massa seca dos nódulos e foram superiores estatisticamente à testemunha (Tabela 3).

Os inóculos que proporcionaram maior nodulação (número e peso dos nódulos secos) também proporcionaram maiores rendimentos de massa seca da parte aérea no caupi (Tabela 3). O rendimento de massa seca do caupi apresentou maior correlação com massa seca ($r=0,85$) do que com o número de nódulos ($r=0,72$). Isto indica que a nodulação foi primordial para o rendimento de biomassa do caupi e que a eficiência simbiótica dos inóculos foi semelhante.

Tabela 3 - Rendimento de massa seca da parte aérea, número e massa seca dos nódulos do feijão caupi (*V. unguiculata* L. (Walp)) colonizados por bactérias provenientes de solos do município de Rio Preto da Eva, AM.

Inóculos	MSPA (g/vaso)	NN/vaso	MNS (mg/vaso)
INPA-RP7	6,34 a	34 a	187,3 a
INPA-RP10	5,44 ab	37 a	171,2 ab
INPA-RP9	5,75 ab	38 a	166,8 abc
INPA-RP8	5,05 ab	37 a	126,5 abcd
INPA-RP1	4,86 abc	46 a	117,6 abcd
INPA-RP3	3,44 bcde	28 ab	94,8 abcde
INPA-RP11	4,21 abcd	15 abc	89,2 bcdef

continua...

Tabela 3 - Rendimento de massa seca da parte aérea, número e massa seca dos nódulos do feijão caupi (*V. unguiculata* L. (Walp)) colonizados por bactérias provenientes de solos do município de Rio Preto da Eva, AM.

Inóculos	MSPA (g/vaso)	NN/vaso	MNS (mg/vaso)	conclusão
INPA-RP5	2,58 def	19 abc	76,3 cdef	
INPA-RP2	3,54 bcde	24 ab	76,2 cdef	
INPA-RP4	3,59 bcde	17 abc	70,4 def	
INPA-RP6	3,67 bcde	31 a	65,4 def	
INPA-RP12	2,30 de	5 bc	14,5 ef	
Testemunha	1,68 e	0 c	0 f	
C.V (%)	10,6	26,3	32,0	

*MSPA-Matéria seca da parte aérea, NN – Número de nódulos e MNS-Massa dos nódulos secos.

** Testemunha: Areia esterilizada sem amostras de solo.

Os dados de NN foram transformados em Raiz quadrada ($x+0,5$) para a análise estatística.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

3.2 TOLERÂNCIA À ACIDEZ E AO ALUMÍNIO TÓXICO

Os resultados de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico dos isolados de rizóbios estão apresentados na Tabela 4.

Observa-se que todos os isolados atingiram altos índices de crescimento em pH 6,5 no período de 18 dias, com exceção do isolado INPA-RP9a, que apresentou índice médio de crescimento. Todas os isolados acidificaram meio com pH 6,5, observando-se a alteração da coloração do meio de azul para amarelo.

Aos 18 dias de avaliação, 33 isolados apresentaram tolerância ao pH 4,5, sendo que 15 apresentaram escore de crescimento maior ou igual ao apresentado no pH 6,5 (Tabela 4). Entre os 36 isolados, 15 apresentaram-se como tolerantes ao pH 4,5 já no terceiro dia de

avaliação (Tabela 4). O meio com pH 4,5 apresentou mudança de coloração de azul para verde claro, indicando um efeito de acidificação, com exceção daqueles com a presença dos isolados tolerantes, INPA-RP8a e INPA-RP4a (Tabela 4). Esta capacidade de acidificar o meio pode ser o indicativo de que esses isolados estejam bem adaptados à acidez. Este fato também foi confirmado pelo teste em pH 6,5 no qual também houve acidificação do meio. Foi observado ainda que apenas os isolados INPA-RP11b e INPA-RP11c comportaram-se como os mais sensíveis até o 18º dia ao pH 4,5 (Tabela 4). Os isolados INPA RP1b, INPA RP1c, INPA RP2c, INPA RP8c, INPA RP12c se comportaram como medianamente tolerantes ao pH 4,5 (Tabela 4).

Entre os isolados tolerantes à acidez, dezenove apresentaram estabilização de crescimento a partir do 6 dia (Tabela 4). Sendo assim, o tempo de crescimento pode também

ser usado como seleção para estes isolados. Os isolados que na presença da acidez, apresentaram maior escore de crescimento em menor período de tempo, podem ser considerados como mais tolerantes a esse fator.

Os resultados mostraram que o alumínio foi mais limitante que a acidez em relação ao crescimento do rizóbio em meio de cultura (Tabela 4), conforme as observações de Brose (1994) e Mukherjee e Asanuma (1998) para outros isolados. Entre os isolados tolerantes à acidez, apenas três se apresentaram como tolerantes ao alumínio no período de 18 dias (INPA-RP1c, INPA-RP6a e INPA-RP11a), enquanto que 16 apresentaram tolerância média e 17 foram sensíveis (Tabela 4). Isto reforça a hipótese de que a tolerância à acidez não indica tolerância ao alumínio (ROSANEM; LINDSTRON, 1997). Os isolados tolerantes ao alumínio apresentaram estratégias diferentes quanto à resistência. Os isolados INPA-RP1c e INPA-RP11a aumentaram o pH do meio, confirmado pela mudança da coloração do meio de cultura de verde para amarelo, o que provavelmente causou complexação do alumínio, transformando-o numa forma não tóxica para as bactérias. O isolado INPA-RP6a baixou o pH do meio, mas comportou-se como tolerante ao alumínio. Provavelmente esse isolado tenha desenvolvido um mecanismo de tolerância a este metal parecido com o que foi observado por Kawai, Zhang e Sugimoto (2000), onde a forma manomérica do alumínio, que é a mais prejudicial, diminui com a elevação da acidez, embora o teor total de alumínio não tenha alterado.

O alumínio interfere no metabolismo do fosfato das células bacterianas, diminuindo o crescimento celular (FLIS; GLENN; DILWORTH, 1993), principalmente em estirpes que acumulam menos P inorgânico no interior das células (MUKHERJEE; ASANUMA, 1998). Há evidência de que o alumínio na célula, se ligue às cargas negativas do grupo fosfato da dupla hélice do DNA, aumentando sua estabilidade e prevenindo sua replicação (FLIS; GLENN; DIL, 1993). O efeito do alumínio sobre o rizóbio pode ser semelhante ao efeito da mitomicina C, um antibiótico mutagênico (WOOD, 1995).

Os isolados tolerantes ao alumínio em condições de laboratório podem ser selecionados para trabalhos em campo onde este fator predomina (HARTEL; ALEXANDER, 1983). Esta tolerância do rizóbio ao alumínio, segundo Flis, Glenn e Dil (1993) parece ser uma característica geneticamente estável, implicando algumas diferenças fisiológicas ou bioquímicas entre os isolados tolerantes e estirpes sensíveis a este cátion.

Rizóbio de solo ácido diminui a quantidade de cargas negativas na superfície celular, diminuindo a ligação com o alumínio (BUSHBY, 1990), eleva o pH interno da bactéria (O'HARA et al., 1989), complexam o alumínio através de polissacarídeos (FLIS; GLENN; DIL, 1993), acumulam fosfato inorgânico no interior da célula (MUKHERJEE; ASANUMA, 1998) neutralizando o efeito do alumínio formando complexo insolúvel biologicamente não tóxico (BLAMY; EDWARDS; ASHER, 1983).

Tabela 4 - Tolerância à acidez e ao alumínio, avaliada *in vitro*, segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999), dos isolados de rizóbio oriundos de solos agrícolas do município de Rio Preto da Eva, Amazonas.

Estirpe	Dias após a riscagem								
	3 Dias			6 Dias			18 Dias		
	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5*	pH 4,5**	pH 4,5 + Al***
INPA-RP1a	3,00	3,00	1,00	3,13	3,20	1,00	3,06	3,31	2,00
INPA-RP1b	3,69	3,00	1,00	3,44	3,13	1,75	4,00	3,00	2,25
INPA-RP1c	3,63	3,00	1,50	4,00	3,00	3,00	4,00	3,00	3,50
INPA-RP2a	2,94	3,00	1,75	3,25	3,13	2,38	3,06	3,31	3,00
INPA-RP2b	4,00	2,70	1,00	4,00	2,90	1,00	4,00	3,20	1,81
INPA-RP2c	1,31	1,50	1,00	2,06	1,50	1,00	3,80	2,25	1,94
INPA-RP3a	3,00	3,38	2,00	3,50	3,25	2,00	3,43	3,50	2,00
INPA-RP3b	4,00	3,44	2,75	4,00	3,44	2,63	4,00	4,00	3,00
INPA-RP3c	4,00	3,50	2,00	4,00	3,63	2,00	4,00	3,38	2,25
INPA-RP4a	3,00	2,19	1,00	3,25	3,44	2,00	4,00	3,44	2,25
INPA-RP4b	3,50	3,20	1,00	3,50	3,20	1,25	4,00	4,00	1,73
INPA-RP4c	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,80	4,00	4,00	2,80
INPA-RP5a	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00	4,00	4,00	1,00
INPA-RP5b	3,38	3,56	2,00	3,44	4,00	2,00	3,56	4,00	2,88
INPA-RP5c	3,35	3,00	1,13	3,63	3,50	1,94	3,63	3,56	2,81
INPA-RP6a	4,00	4,00	1,25	4,00	4,00	3,00	4,00	4,00	3,63
INPA-RP6b	3,25	3,00	1,00	3,38	3,44	1,00	3,75	3,38	1,25
INPA-RP6c	4,00	3,06	1,19	4,00	3,25	1,75	4,00	3,56	2,25
INPA-RP7a	3,31	3,00	2,00	3,38	3,00	2,56	3,44	3,13	2,88
INPA-RP7b	4,00	3,06	1,44	4,00	3,13	2,81	4,00	3,13	2,81
INPA-RP7c	4,00	4,00	1,38	4,00	4,00	2,10	4,00	4,00	2,38
INPA-RP8b	3,00	3,00	1,50	3,00	3,00	2,00	3,75	3,56	2,00
INPA-RP8c	3,25	3,00	2,50	3,31	3,00	2,38	4,00	3,00	2,50
INPA-RP9a	3,00	2,94	1,00	3,00	3,25	1,00	3,00	3,13	1,00
INPA-RP9b	3,25	3,00	1,25	3,38	3,00	1,75	3,38	3,06	2,00
INPA-RP9c	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,06	4,00	4,00	2,00
INPA-RP10a	3,60	3,40	1,25	4,00	4,00	1,20	4,00	4,00	1,00
INPA-RP10b	4,00	2,88	1,00	4,00	2,88	1,00	4,00	3,06	1,00
INPA-RP10c	1,50	1,25	1,00	4,00	2,38	1,00	4,00	4,00	1,25
INPA-RP11a	3,20	4,00	2,30	4,00	4,00	2,25	4,00	4,00	3,38
INPA-RP11b	3,00	2,63	1,50	3,06	2,75	2,00	4,00	2,75	3,00
INPA-RP11c	1,44	1,06	1,00	2,88	2,75	1,00	3,19	1,75	1,00
INPA-RP12a	3,56	2,50	1,44	4,00	2,50	1,69	4,00	3,19	1,75
INPA-RP12b	3,40	3,00	2,50	3,40	3,00	2,13	4,00	4,00	2,63
INPA-RP12c	3,00	2,00	1,00	3,50	2,69	1,00	4,00	3,00	1,00

* Todos os isolados acidificaram o meio de cultura.

3.3 SOLUBILIZAÇÃO DE P-Ca

Entre os 36 isolados de rizóbio, 26 foram capazes de solubilizar o P-Ca no período de 18 dias, sendo que apenas oito apresentaram solubilização média (Tabela 5). Nenhum dos isolados apresentou alta solubilização de P-Ca. Dentre os isolados capazes de solubilizar o P-Ca, 23 se comportaram como precoce e três como tardios (Tabela 5). Segundo Peix et al. (2001), isolados de rizóbio foram efetivos quanto à solubilização de P-Ca em laboratório, no entanto, a eficiência de solubilização variou entre os isolados.

A capacidade de estirpes de rizóbio solubilizar o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos (MIKANOVA; KUBAT, 1999; MIKANOVA, 2000). Este resultado indica a possibilidade de utilizar a atividade de solubilização de fosfatos dos rizóbios para incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição das plantas com esse nutriente. Chabot et al. (1988) observaram incremento no rendimento de massa seca do milho, enquanto Mikanova et al. (1995), Mikanova e Kubát (1999) e Peix et al. (2001) detectaram aumento na produtividade de ervilha, soja e feijão, respectivamente, quando inoculados com bactérias solubilizadoras de fosfato.

3.4 SOLUBILIZAÇÃO DE P-Al

Entre os isolados avaliados, 47% (17) solubilizaram o P-Al no terceiro de dia de repicagem (Tabela 6). No entanto, todos

apresentaram índice de solubilização baixo até o 15º dia de avaliação. Silva Filho e Vidor (2000) observaram que alguns isolados de fungos também apresentaram baixa capacidade solubilizadora de P-Al, cuja relação diâmetro do halo e da colônia esteve próxima de 1. Esperava-se que houvesse uma maior proporção desses solubilizadores em relação aos que solubilizam P-Ca em função de que o P-Al é a forma mais predominante nos solos da região.

A produção de ácidos orgânicos por microrganismos é um importante mecanismo para solubilizar o $AlPO_4$, como também a liberação de íons de H^+ (ILMER; SCHINNER, 1995). Entre os ácidos orgânicos envolvidos na complexação do alumínio, o citrato é o principal (FULTON; JAW; JEFFERY, 1989). Os trabalhos envolvendo a solubilização de P-Al são escassos, e nenhum até o momento, foi realizado para investigar o papel da população de rizóbio neste processo, embora, nas condições tropicais e subtropicais, sejam as formas predominantes de fosfato (RAIJ, 1991).

Há a necessidade de se desenvolver mais pesquisa enfocando este mecanismo de sobrevivência dos rizóbios em solos da região, para que possa selecionar isolados não só capazes de tolerar à acidez e ao alumínio tóxico, mas que também possam solubilizar o P insolúvel, para ser utilizado futuramente como inoculante em leguminosas de interesse agrícola.

Tabela 5 - Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) dos isolados de rizóbio oriundos de solo ácido do município de Rio Preto da Eva, AM.

Isolados	Início da solubilização (Dia)	I. S.		Solubilização
		Inicial (mm)	Final (mm)	
INPA-RP1a	3	2,8 (médio)	3,2 (médio)	Precoce
INPA-RP1c	3	2,5 (médio)	3,3 (médio)	Precoce
INPA-RP2a	3	1,2 (baixo)	1,2 (baixo)	Precoce
INPA-RP2c	3	2,7 (médio)	1,3 (baixo)	Precoce
INPA-RP3a	3	2,1 (médio)	2,5 (médio)	Precoce
INPA-RP3b	3	1,5 (baixo)	1,8 (baixo)	Precoce
INPA-RP3c	3	1,4 (baixo)	1,9 (baixo)	Precoce
INPA-RP4c	9	1,3 (baixo)	1,1 (baixo)	Tardio
INPA-RP5a	3	1,5 (baixo)	1,2 (baixo)	Precoce
INPA-RP5b	9	1,3 (baixo)	1,2 (baixo)	Tardio
INPA-RP6a	3	2,5 (médio)	2,3 (médio)	Precoce
INPA-RP6b	3	2,8 (médio)	3,3 (médio)	Precoce
INPA-RP6c	3	1,7 (médio)	1,3 (baixo)	Precoce
INPA-RP7a	3	2,9 (médio)	2,7 (médio)	Precoce
INPA-RP7b	3	0,6 (baixo)	1,1 (baixo)	Precoce
INPA-RP7c	3	1,2 (baixo)	1,1 (baixo)	Precoce
INPA-RP8a	3	3,1 (médio)	3,6 (médio)	Precoce
INPA-RP8c	3	1,3 (baixo)	1,2 (baixo)	Precoce
INPA-RP9a	3	1,3 (baixo)	1,1 (baixo)	Precoce
INPA-RP9b	3	2,4 (médio)	2,0 (médio)	Precoce
INPA-RP9c	3	2,3 (médio)	1,6 (baixo)	Precoce
INPA-RP11a	3	1,2 (baixo)	1,5 (baixo)	Precoce
INPA-RP11b	6	0,6 (baixo)	0,8 (baixo)	Tardio
INPA-RP11c	3	1,4 (baixo)	1,1 (baixo)	Precoce
INPA-RP12a	3	1,4 (baixo)	1,1 (baixo)	Precoce
INPA-RP12c	3	3,1 (médio)	1,8 (baixo)	Precoce

Tabela 6 - Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio (P-Al) dos isolados de rizóbio oriundos de solo ácido do município de Rio Preto da Eva, AM.

Isolados	Início da solubilização (Dia)	I. S.		Solubilização
		Inicial (mm)	Final (mm)	
INPA-RP1b	3	1,50 (baixo)	1,15 (baixo)	Precoce
INPA-RP1c	3	1,00 (baixo)	1,02 (baixo)	Precoce
INPA-RP2a	3	1,00 (baixo)	1,13 (baixo)	Precoce
INPA-RP2c	3	1,11 (baixo)	1,08 (baixo)	Precoce
INPA-RP3a	3	1,06 (baixo)	1,14 (baixo)	Precoce
INPA-RP3b	3	1,00 (baixo)	1,13 (baixo)	Precoce
INPA-RP4a	3	1,09 (baixo)	1,15 (baixo)	Precoce
INPA-RP5c	3	1,09 (baixo)	1,09 (baixo)	Precoce
INPA-RP6a	3	1,26 (baixo)	1,35 (baixo)	Precoce
INPA-RP6c	3	1,08 (baixo)	1,07 (baixo)	Precoce
INPA-RP7a	3	1,09 (baixo)	1,08 (baixo)	Precoce
INPA-RP7c	3	1,06 (baixo)	1,18 (baixo)	Precoce
INPA-RP8b	3	1,00 (baixo)	1,05 (baixo)	Precoce
INPA-RP9a	3	1,00 (baixo)	1,10 (baixo)	Precoce
INPA-RP9b	3	1,00 (baixo)	1,06 (baixo)	Precoce
INPA-RP9c	3	1,00 (baixo)	1,06 (baixo)	Precoce
INPA-RP11a	3	1,00 (baixo)	1,10 (baixo)	Precoce

4 CONCLUSÃO

- Os isolados INPA-RP1, INPA-RP3, INPA-RP87, INPA-RP8, INPA-RP9 e INPA-RP10 apresentaram potencial como inóculos para o caupi.
- A nodulação foi fundamental para o rendimento de massa seca, sendo que a mesma se correlacionou principalmente com a massa seca dos nódulos.
- A maioria dos isolados apresentou tolerância à acidez nas condições de laboratório num período de 18 dias, e o alumínio foi mais limitante que a acidez para o crescimento do rizóbio.
- A maioria dos isolados foi capaz de solubilizar o P-Ca, e a solubilização do P-Al foi

considerada baixa para todos os isolados que apresentaram essa característica.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos dedico à Andressa Druhan e a Bryan J. Druhan pelas correções do abstract, ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), e ao CNPq, pela bolsa de pós-graduação ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

- BLAMY, F. P. C.; EDWARDS, D. G.; ASHER, C. J.. Effects of aluminium, OH:Al and P:Al molar ratios and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Science*, v. 136, n. 1, p. 197-207, 1983.
- BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, F.M.M.. *Rhizobium spp.* populations, and mycorrhizal associations in some plantations of forest tree species. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 19, n. 1, p. 137-142, 1984.
- BROSE, E. Rhizobia selection for white clover in acid soil. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 29, n. 2, p. 281-285, 1994.
- BUSHBY, H. V. A. The role of bacterial surface charge in the ecology of root nodule bacteria: an hypothesis. *Soil Biol. Biochem.*, v. 22, n. 1, p. 1-9, 1990.
- CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOPPER, J. W.; AUTON, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* Biovar phaseoli. *Soil Biol. Biochem.*, v.30, n. 112, p. 1615-1618, 1998.
- CLINE, G. R.; SENWO, Z. N. Tolerance of lespedeza *Bradyrhizobium* to acidity, aluminium, and manganese in culture media containing glutamate or ammonium. *Soil Biol. Biochem.*, v. 26, n. 8, p. 1067-1072, 1994.
- FLIS, S. E.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J.. The interaction between aluminium and root nodule bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, v. 25, n. 4, p. 403–417, 1993.
- FULTON, B.; JAW, S.; JEFFERY, E. Bioavailability of aluminium from drinking water. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 12, n. 1, p. 144-150, 1989.
- GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agri.*, v. 1, n. 1, p. 51-57, 1986.
- HARTEL, P. G.; ALEXANDER, M. Growth and survival of cowpea rhizobia in acid aluminium-rich soils. *Soil Sci. Soc. of Am. J.*, v. 47, p. 502-506, 1983.
- Ilmer, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates – solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.*, v. 27, n. 3, p. 257-263, 1995.
- JOHNSON, A. C.; WOOD, M.. DNA, a possible site of aluminium toxicity in *Rhizobium*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 56, p. 3629-3633, 1990.
- KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, n. 2, p. 143-147, 2000.
- MIKANOVA, O. *Study of the P-solubilizing microorganisms and their utilization for improving plant nutrition*. 2000. (Dissertation) - Czech University of Agriculture Prague/Faculty of Agronomy, 2000.
- _____ ; KÚBAT, J. Practical use of P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinná Vyroba*, v. 45, n. 9, p. 407-409, 1999.
- _____ ; _____; VORISEK, K.; RANDOVÁ, D. The capacity of the strains of *Rhizobium leguminosarum* to make phosphorus available. *Rostlinná Vyroba*, v. 41, n. 9, p. 423-425, 1995.

- MUKHERJEE, K.; ASANUMA, S. Possible role of cellular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminium tolerance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.*, v. 30, n. 12, p. 1511-1516, 1998.
- NICHOLAIDES, J. J. I.; SANCHEZ, P. A.; BANDY, D. E.; VILLACHIA, J. H., COUTU, A. J.; VALVERDE, C. S.. Crop production systems in the Amazon Basin. In: MORAN, E. (Ed.). *The dilemma of amazonian development*. Boulder: Westview, 1983.
- OCTIVE, J. C.; JOHSON, A. C.; WOOD, M. Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soil Biol. Biochem.*, v. 26, n. 11, p. 1477-1482, 1994.
- OLIVEIRA, L. A. de; MAGALHÃES, H. P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 1, p. 203-208, 1999.
- O'HARA, G. W.; GOSS, T. J. ; DILWORTH, M. J.; GLENN, R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 1870-1876, 1989.
- PEIX ; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ – MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing a strains of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.*, v. 33, n. 1, p. 103-110, 2001.
- RAIJ, B. van. *Fertilidade do solo e adubação*. São Paulo: Ceres, 1991. 347 p.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.. Phosphae solubilizing bacteria oct. their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, oct. 1999.
- ROSANEM, L. A.; LINDSTRON, K. Stability of short and long O-chain lipopolysaccharides types in *Rhizobium galegae* and their correlation with symbiotic properties and growth conditions, tolerance of low pH, aluminium and salt in the growth medium. *FEMS Microbiology Letters*, v. 155, n 1, p. 17-22, 1997.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C.. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. bras. Ci. Solo*, v. 24, p. 311-319, 2000.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982
- SMITH, G. S.; JOHSON, C. M.; CORNFORTH, I. S.. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytol*, v. 94, p. 537-548, 1983.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J.. *Methods in legume-Rhizobium technology*. Mauri: Niftal, 1985. 365p.

SPECHT, A. W.; ERDMAN, L. W.; MEANS, V. M.; RERNICKY, J. W.. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, v. 29, p. 489-495, 1956.

STARKANOVA, G.; VORISEK, K.; MIKANOVA, O.; RONDOVA, D. P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinna Vyroba*, v. 45, n. 9, p. 403-406, 1999.

VINCENT, J. M. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scient. Publ, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G.; GLENN, A. R. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Soil Biol. Biochem.*, v. 32, p. 1393-1403, 2000.

WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant and Soil*, v. 171, p. 63-69, 1995.