



Microbiologia de Solo e Sedimento

ESTUDO DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO *IN VITRO* POR RIZÓBIOS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L) Walp)

MARCIONILA G. MALHEIRO^{1*}; MICHELLY ÉLEN L. MENEZES²; JAKSON LEITE¹;
ERNANDO F. MOTA³; CARLOS ALBERTO T. GAVA⁴; LUIZ B. MORGADO⁴; GUSTAVO
RIBEIRO XAVIER⁵; LINDETE MÍRIA V. MARTINS⁶

¹Bolsista Iniciação Tecnológica Industrial / CNPq DTI-3/CNPq e-mail: malheiro@cpatsa.embrapa.br;

²Bolsista Embrapa Semi-Árido; ³Técnico Embrapa Semi-Árido; ⁴Embrapa Semi-árido; ⁵Embrapa Agrobiologia; ⁶UNEB.

INTRODUÇÃO

O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) é uma das leguminosas herbáceas bem adaptadas às condições brasileiras de clima e solo, sendo cultivada para alimentação humana e animal nas regiões Norte e Nordeste. Por sua rusticidade e potencial para desenvolver-se em condições adversas, e, em função da habilidade em obter o nitrogênio necessário a seu desenvolvimento por meio do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), apresenta considerável importância agrícola no Brasil (Carvalho, 2003). Nesse contexto, a utilização de bactérias do gênero *Rhizobium* é uma prática chave para o manejo agrícola sustentável das zonas semi-áridas, visando uma menor dependência da aplicação de fertilizantes químicos, pois além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo e disponibilizar o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo um melhor desempenho. Devido à existência de uma grande diversidade de espécies nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio dentre os microrganismos do solo, se faz necessário a obtenção de estirpes de rizóbio capazes de sobreviver e competir pela fixação eficiente do nitrogênio atmosférico quando associada à leguminosa alvo e disponibilizar o fósforo pela eficiência na solubilização de fosfato, reduzindo a aplicação de nitrogênio e fósforo quimicamente, de acordo com os princípios da agricultura ecologicamente sustentável. Este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar diferentes isolados de rizóbio em planta isca de feijão-caupi, buscando avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio *in vitro* em meio salino básico.

MATERIAL E METÓDOS

O estudo foi realizado sob condições de laboratório na Embrapa Semi-Árido no município de Petrolina-Pe, sendo utilizado os isolados estocados do trabalho de caracterização morfológica de rizóbios nativos em cinco amostras de solos sobre diferentes formas de manejo, sendo identificados como S1: Área de chapada com plantio de feijão-caupi, S2: Caatinga de Volta do Riacho-PE, S3: Área de vazante com cultivo de caupi, S4: Área em pousio, S5: Caatinga próxima à margem do Rio São Francisco, obtidos de cinco variedades de feijão-caupi. As avaliações de solubilização de fosfato, através do isolamento das bactérias em meio salino básico (MSB), foi desenvolvido por Sylvestre-Bradley et al, (1982), contendo 10g de dextrose, 2g de extrato de levedura (colocado após autoclavagem), 20g de ágar e 5g de CaHPO₄ por litro de meio. Nesse meio foi acrescentada uma solução A de Hoagland em volume por litro, contendo 6ml CaCl₂ para formação do cálcio precipitado; 1,6ml de MgSO₄.7H₂O e 16ml de K₂SO₄ (Hoagland & Arnon, 1950). Outra solução foi adicionada com 4ml volume por litro de



Microbiologia de Solo e Sedimento

meio contendo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; H_3BO_3 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e por fim 4ml volume por litro de meio de Fe EDTA. Os isolados de rizóbio, crescidos em meio YMA com azul de bromotimol (pH 6.8), foram repicados para o meio de solubilização com o auxílio de uma alça de platina; retirou-se uma porção do isolado estocado em glicerina e realizou-se um leve toque no meio de cultura para cada colônia. Foram estabelecidas cinco colônias por placa, em três repetições por isolado. O diâmetro do halo de solubilização foi medido a cada dois dias, sendo percebido como uma área translúcida em torno da colônia correspondente a dissolução do fósforo em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio havendo uma acidificação do meio de dissolução do fósforo (Kang, 2005), utilizando-se um paquímetro digital, por um período de 15 dias para medição dos halos bem como o diâmetro das colônias. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de solubilização (IS) de acordo com Berraquero et al (1976), para cada isolado, através da fórmula: $\text{IS} = \text{medida do halo em milímetro dividido pelo valor em milímetro da colônia}$. Com base nos índices, os isolados foram classificados por capacidade de solubilização como baixa ($\text{IS} < 4$), média ($4 \leq \text{IS} \leq 9$) e alta ($\text{IS} > 9$). Os isolados foram classificados, também, quanto ao início da solubilização: precoces – até o quarto dia; tardio – a partir do quarto dia; não solubilizadores – sem solubilização visível até o 15º dia de avaliação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 370 isolados avaliados, 195, correspondentes a 53%, apresentaram capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio, formando em torno das colônias um halo facilmente visível por contraste com o meio opaco: 8 % com índices de solubilização ($\text{IS} < 4$); 25% com ($4 \leq \text{IS} \leq 9$) e 20% de solubilizadores ($\text{IS} > 9$). O índice de solubilização variou de 1,0 a 14,3. Houve pouca variação quanto ao potencial de solubilização desses isolados, não apresentando diferenças no crescimento do halo durante os dias observados.

Referente à classificação do aparecimento das colônias, foram observadas bactérias solubilizadoras após 24 h de incubação. Estas bactérias foram isoladas dos solos S2 e S5 e classificadas como precoces, sugerindo uma diversificação desses microrganismos, ou sua adaptação às condições edafoclimáticas do semi-árido. As bactérias dos demais solos (S(2)1, S3 e S4) não apresentaram solubilização mas um halo de solubilização tardio, iniciando a solubilização após o quarto dia de repicagem. Os valores obtidos contrastam com os de Silva Filho & Vidor (2000) que observaram índices variando de 1,06 a 1,24 com isolados de feijão guandu em solos ácidos de Iranduba, Amazonas.

CONCLUSÕES

Os isolados capturados dos solos de Caatinga nativa apresentaram maior eficiência na solubilização de fosfato.

AGRADECIMENTOS

Ao MCT/CNPq, DECIT/MS, Fundo Setorial de Biotecnologia (CT-BIOTECNOLOGIA) e Saúde (CT-SAÚDE) pelo financiamento do projeto no âmbito do Edital RENORBIO e pela concessão das bolsas de Iniciação Tecnológica e Industrial.



Microbiologia de Solo e Sedimento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERRAQUEIRO, 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, p.399-406, 1976

CARVALHO, F.G. 2003. Variabilidade de Isolados de Estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para cultura da soja. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 104 p.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University. of California, 1950. 32p.

KANG, S.C.; HÁ, C. G.; LEE, T.G.; MAHESHWARI, D.K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science**. Bangalore, v.82, n.4, p.439-442, fev. 2002.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Viscosa, MG, v.24, n.2, p.311-329, mar/abr. 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 fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.