

**INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE CULTIVO
E DA TURFA NO COMPORTAMENTO DE
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium***

DIVINO LEVI MIGUEL

2000

DIVINO LEVI MIGUEL

**INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE CULTIVO E DA TURFA NO
COMPORTAMENTO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Miguel, Divino Levi

Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* / Divino Levi Miguel. -- Lavras : UFLA, 2000.
38 p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Turfa. 2. *Bradyrhizobium*. 3. Meio de cultivo. 4. pH I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46
-589.90133
-589.95

DIVINO LEVI MIGUEL

**INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE CULTIVO E DA TURFA NO
COMPORTAMENTO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium***

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do Curso
de Pós-Graduação em Agronomia, área de
concentração em Solos e Nutrição de Plantas,
para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 26 de maio de 2000

Prof. José Oswaldo Siqueira - UFLA

Prof. Romildo da Silva -UFLA



Prof a. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A meus pais, Gessy e Helena,

A meus irmãos, Zé Paulo, Magna, Leia e Lú,

pelo amor, carinho e felicidade,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir vencer mais essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a CAPES pela oportunidade de realização do curso e concessão da bolsa de estudos.

À Profa. Fátima M.S. Moreira, pela orientação e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do curso e de fora dele, principalmente àqueles que foram solidários em momentos difíceis.

Aos velhos e novos amigos da(s) REPÚBLICA(S).

Ao Paulo Henrique, pelo auxílio, sugestões e apoio na conclusão deste trabalho.

À Lurdinha e familiares, pelo amor, acolhida e amparo nas hora difíceis.

A todos do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo convívio e contribuição na realização deste trabalho.

A todo corpo docente, discente e funcionários do Departamento de Ciência do Solo, e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	2
2.1 Mecanismos que determinam a tolerância de rizóbio ao estresse causado pela acidez.....	6
2.2 Produção de inoculantes.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Estirpes estudadas.....	12
3.2 Comportamento das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp em meio líquido com diferentes valores de pH de cultivo.....	12
3.3 Resposta da soja a inoculantes produzidos com estirpes cultivadas em diferentes valores de pH.....	14
3.4 Sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp cultivadas em inoculante turfoso com diferentes valores de pH.....	16
3.5 Cálculo e análises estatísticas.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Comportamento das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em meio líquido com diferentes valores de pH de cultivo.....	20
4.2 Resposta da soja a inoculantes produzidos com estirpes cultivadas em diferentes valores de pH.....	23
4.3 Sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp cultivadas e inoculadas em turfa com diferentes valores de pH.....	26
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7 ANEXO	41

RESUMO

MIGUEL, D.L. **Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium***. Lavras: UFLA, 2000. 40p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)*

A acidez dos solos representa um problema que afeta grandes áreas agrícolas pelo mundo, principalmente nos trópicos, onde os teores de fósforo e nitrogênio são limitados. No caso do nitrogênio, a fixação biológica se torna uma das alternativas ecológica, ambiental e economicamente mais viáveis, por diminuir o uso e o impacto causado pelos fertilizantes nitrogenados. Neste trabalho, foram realizados dois experimentos *in vitro* e um em casa de vegetação com quatro estirpes de *Bradyrhizobium* (Br 4406, Br 29, SEMIA 587 e INPA 03-11b) no Departamento de Ciência do Solo (UFLA) para efeito de três valores de pH (5,0; 6,0; 6,9) no crescimento em meio de cultura YM e na sobrevivência em inoculantes produzidos com turfa, assim como seu efeito na soja. No primeiro experimento, as estirpes de *Bradyrhizobium* tiveram um comportamento diferenciado em meio líquido com pH 5,0, obtendo melhor desempenho em pH 6,0, tanto em número de unidades formadoras de colônias quanto em produção de exopolissacarídeos. No terceiro experimento, com exceção da Br 29 que teve melhor sobrevivência de células em pH 6,0, as outras estirpes tiveram sobrevivência semelhante. O melhor comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* em pH 6,0 no meio de cultura e sua sobrevivência em turfa demonstram a possibilidade do uso de inoculantes corrigidos para esse valor de pH, como modo de pré-adaptação à condição de pH baixo dos solos tropicais. O número de nódulos, atividade da nitrogenase, massa seca de nódulos, raízes e parte aérea de plantas de soja, de modo geral, não foram influenciados pelos valores de pH de cultivo testados. Entretanto, a estirpe INPA 03 -11b se mostrou efetiva, apresentando número de nódulos e atividade de Nase semelhantes a Br 29 e Br 96, que são recomendadas como estirpes inoculantes, devendo, assim, ser indicada para testes de eficiência a campo.

* Orientadora Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

ABSTRACT

MIGUEL, D.L. Influence of medium and pet pH in the behaviour of *Bradyrhizobium* strains. Lavras: UFLA, 2000. 40p. (Master in Soil Science and Plant Nutrition)*

Soil acidity is one of the greatest problems of agricultural lands around the world, mainly in the tropics where phosphorus and nitrogen are also limiting factors. In the case of nitrogen, biological nitrogen fixation is the most economical and ecological alternative to decrease the use and impact caused by nitrogen fertilizers. Two "in vitro" experiments and one under greenhouse conditions with four *Bradyrhizobium* strains (BR 4406, BR 29, SEMIA 587 and INPA 03-11B) were carried out at Soil Science Department, Federal University of Lavras, aiming to verify the effect of 3 pH values (5,0; 6,0 and 6,9) at the growth in YM medium, soybean symbiosis and pet survival. In the first experiment *Bradyrhizobium* strains behaved differently at the different pH values of YM medium, but had the highest colony forming unities and exopolysaccharide production at pH 6,0. In the second experiment nodule number (NN), nitrogenase (Nase) activity, dry matter of nodules (NDM), roots (RDM) and shoots (SDM) of soybean were not affected by the different pH values of the culture medium used to produce pet inoculants. INPA 03-11B had similar efficiencies to BR 29 and SEMIA 587, that are recommended as inoculant strains for soybean, at the production of NN, Nase activity, NDM, RDM and SDM. At the third experiment excepting BR29 that had highest survival at pH 6,0, the other strains had the same cell survival at this pH and pH 6,9. The best behaviour of *Bradyrhizobium* strains at pH 6,0 in culture medium and in pet survival shows the possibility to use this pH value in the pet inoculant production as a mean of acid habituation to this soil stress condition in the tropics.

* Guidance Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada pela simbiose de rizóbio com leguminosas de grãos, como a soja, pode suprir as necessidades de nitrogênio dessa cultura quando a nodulação por estirpes eficiente é estabelecida. Assim, a inoculação de estirpes selecionadas de comprovada eficiência tem se mostrado uma das alternativas mais viáveis, ecológica e economicamente, alcançando produções equivalentes às obtidas com fertilizantes nitrogenados, além de diminuir o uso e o impacto causado por eles (Dobereiner e Duque, 1980). Entretanto, além dos trabalhos de seleção de estirpes para maior competitividade e eficiência, uma vez que a maioria dos solos cultivados com soja já receberam inoculantes, é necessária adaptação às condições edáficas pré-existentes, principalmente o pH baixo, pois elas influenciam a capacidade de sobrevivência, multiplicação, infecção da espécie hospedeira pelos rizóbios, suprimindo a formação dos nódulos e, conseqüentemente, a FBN (Franco, Fonseca e Marriel, 1978; Vargas e Suhet, 1980a; Vargas, Peres e Suhet, 1982).

Os efeitos do pH baixo sobre estirpes nativas e comerciais têm sido estudados na tentativa de selecionar estirpes tolerantes a acidez (O'Hara, e Glenn, 1994; Souza, Magalhães e Oliveira, 1984; Silva e Franco, 1984; Keyser e Mumns, 1979a, 1979b). O comportamento diferencial de estirpes de rizóbio em meio de cultura com valores de pH ácido pode auxiliar na identificação e seleção de estirpes que possivelmente implicariam em melhor sobrevivência destas nos inoculantes comerciais produzidos, estabelecendo uma simbiose eficiente nas condições de acidez predominante nos solos tropicais cultivados com soja.

Este trabalho teve por objetivo verificar se o pH do meio de cultivo e de preparo da turfa pode promover alterações benéficas no crescimento em meio de

cultura, sobrevivência na turfa e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os solos ácidos são distribuídos por grandes áreas pelo mundo (Wright, Baligar e Murrmann, 1991) atingindo grandes áreas, seja nas regiões temperadas ou tropicais. Segundo Eswaran, Reich e Beinroth (1997), em torno de 26% (cerca de 3,8 milhões de hectares) de toda área potencialmente agrícola no mundo tem problemas de produção associados a acidez do solo, sendo que, apenas na América do Sul, 66% dos solos são ácidos, dos quais 50% também encontram-se com o subsolo ácido.

A acidez dada pela concentração do íon H^+ (acidez ativa) e expressa na escala de pH, normalmente está associada a outros fatores como saturação e toxidez por alumínio e manganês, baixa CTC e disponibilidade de nutrientes. O pH baixo do solo atua negativamente nas atividades da microbiota do solo, principalmente dos microrganismos benéficos ao desenvolvimento e/ou produção das plantas como os rizóbios, limitando sua multiplicação e sobrevivência, conseqüentemente reduzindo a nodulação e fixação de nitrogênio (Graham, 1991; Hartel e Alexander, 1983; Graham et al., 1982).

Para o cultivo da soja e outras leguminosas em solo com características de elevada acidez, principalmente aqueles sob vegetação de cerrados, é desejável que as estirpes de rizóbio utilizadas em inoculantes fossem adaptadas a essas condições edáficas, além de possuírem características de competitividade e eficiência, uma vez que a capacidade de sobrevivência, dispersão, multiplicação e colonização do sistema radicular é uma peculiaridade intrínseca e de suma importância ao microsimbionte (Howieson e Ewing, 1986; Oliveira e Vidor,

1984a, 1984b). Assim, as estirpes estabeleceriam-se melhor, proporcionando uma nodulação adequada mesmo sob tais condições.

Os microrganismos do solo, além de apresentarem uma grande biodiversidade que lhes permite sobreviver em diversos habitat (Parkinson e Coleman, 1991), possuem uma variabilidade genética que proporciona, no caso de rizóbio, diferenças no desempenho simbiótico que podem ser detectadas após a adaptação das estirpes ao solo, sendo possível selecionar estirpes com alta capacidade fixadora de nitrogênio (Graham et al., 1982; Ayanaba, Asanuma e Munns, 1983).

Diferenças na capacidade de crescimento em meio de cultura com o intuito de simular os estresses associados à maior concentração do íon H^+ são citadas em vários trabalhos sobre a tolerância ao pH baixo de estirpes de rizóbio, além de distúrbios nutricionais (Dilworth et al., 1999; Reeve et al., 1997; O'Hara e Glenn, 1994; Richardson e Simpson, 1989; Cunningham e Munns, 1984a, 1984b).

Keyser, Munns e Hohenberg (1979) avaliaram 21 estirpes do grupo caupi em casa de vegetação quanto à capacidade de crescimento em meio líquido (pH 4,5) e concluíram que algumas estirpes possuíam uma combinação importante em termos de alta efetividade e tolerância simbiótica à acidez do solo, portanto, podendo ser selecionadas em meios artificiais a fim de serem utilizadas em inoculantes comerciais. Entretanto, Bromfield e Jones (1980), trabalhando com *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e Howieson, Robson e Abbot (1992), com *Rhizobium meliloti*, sugerem que o comportamento de estirpes com capacidade para crescer em meios artificiais ajustados a pH baixo parece relacionar-se pouco com seu comportamento no solo. Já as exigências em crescimento das estirpes sob condições controladas de pH relacionam-se bem com as exigências para a nodulação de seus hospedeiros (Munns, 1977). Assim, a origem de isolamento das estirpes e sua tolerância à acidez também parecem

ter boa correlação (Vargas e Denardin, 1992; Howieson, Robson e Abbot, 1992; Howieson e Ewing, 1986; Silva e Franco, 1984).

Date e Halliday (1979) demonstraram que algumas estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo ácido eram incapazes de crescer em meio de cultura com pH neutro. Resultados similares foram encontrados por Souza, Magalhães e Oliveira (1984), sendo que algumas das estirpes de rizóbio isolados de leguminosas florestais nativas de solos ácidos de terra firme da Amazônia foram capazes de crescer em meio de cultura sólido com valor de pH igual a 5,0, mas não puderam crescer em meio com pH igual a 7,0.

Selecionando estirpes de rizóbio em meio de cultura ácido sólido, Silva e Franco (1984) identificaram 95 entre 211 estirpes de leguminosas arbóreas capazes de crescer em pH 4,6, sendo que 76 destas alcalinizaram o meio e 15 cresceram sem modificar o pH e as 4 restantes acidificaram o meio. A capacidade de alcalinizar o meio de cultura é sugerida por Marriel (1984) como característica determinante da tolerância a acidez de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 527 e SEMIA 532) submetidas em meio líquido com pH 4,5.

A tolerância ao pH baixo pode variar tanto entre as estirpes de rizóbio (Hartel e Alexander, 1983) como entre espécies hospedeiras (Tang e Thompson, 1996), mas, sobretudo, no processo simbiótico (Cline e Kaul, 1990; Alva et al., 1987). O insucesso no estabelecimento de pastagens de medicago (*Medicago truncatula*) em solos do leste da Austrália com pH baixo foi atribuído por Robson e Loneragan (1970a, 1970b) ao pouco crescimento e à sensibilidade a acidez das estirpes de rizóbios utilizadas nos inoculantes comerciais. Entretanto, o emprego de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* isoladas de solos ácidos do Mediterrâneo (Howieson e Ewing, 1986; Howieson, Ewing e D'Antuono, 1988) com melhor desempenho simbiótico, baseado na variabilidade genética natural

das estirpes, resultaram no sucesso do processo simbiótico proporcionando o estabelecimento da vegetação (Howieson et al., 1991).

Isolados de *Rhizobium meliloti* de solos ácidos, foram significativamente superiores em colonizar um solo areno-argiloso moderadamente ácido (pH 5,0) em relação às estirpes de inoculantes comerciais (U45 e CC169) e estirpes isoladas de solos alcalinos (Howieson e Ewing, 1986). Estes mesmos autores, no segundo ano de plantio, amostraram plantas noduladas a 1 a 10 e 11 a 20 cm a partir do ponto de inoculação do primeiro ano. O fato de estarem noduladas foi atribuído à capacidade de sobrevivência, dispersão lateral e nodulação das estirpes, embora a dispersão lateral e nodulação tenham diminuído quando o pH do solo não foi elevado, indicando que a colonização pelos isolados foi limitada pela pH baixo. Entretanto, Wood e Shepherd (1987) não encontraram variabilidade para tolerância a pH baixo em estirpes isoladas a curtas distâncias (70 cm) de solos com diferentes valores de pH, sugerindo certo grau de uniformidade genética entre as estirpes. Os autores sugerem que as estirpes migraram através de microsítios, como sugerido para bactérias nitrificadoras (Hankinson e Schmidt, 1984), das regiões de maior acidez (pH 4,5) para aquelas onde a sobrevivência não necessita de adaptação. Assim, solos ácidos não teriam necessariamente rizóbio tolerantes a pH baixo ou alumínio, portanto, não seriam fontes de variabilidade genética para tolerância a esses estresses, como sugerido por outros estudos (Howieson e Ewing, 1986; Lowendorf e Alexander, 1983a, 1983b; Keyser, Munns e Hohenberg, 1979).

O crescimento e a nodulação de *Acacia mangium* e *Faidherbia albida* são mais afetados pela acidez (pH 4,5-meio líquido) do que pelo alumínio (mesmo com 100 μM de AlCl_3 , meio sólido) (Lesueur et al., 1993), sugerindo que a capacidade da planta hospedeira em tolerar os estresses causados pela acidez deve ser primeiramente verificada. Resultados similares foram encontrados por Cline e Kaul (1990) ao compararem os efeitos da toxidez do Al

versus os fatores relacionados a acidez (H-ion, Mo e Mn) em solos ácidos (pH 4,6 e 4,8), onde o crescimento e a fixação de nitrogênio em soja foram mais limitados pelos efeitos tóxicos do íon H⁺ e do manganês.

Embora a soja pareça tolerar a excessiva acidez (pH 4,5) (Munns e Keyser, 1981), a toxicidade do íon H⁺ pode limitar a fixação de nitrogênio em solos ácidos. Alva et al. (1987) encontraram uma maior redução da nodulação da soja em solução nutritiva pH 4,5 comparada com pH 5,5 na ausência de metais tóxicos. Segundo Richardson et al. (1988), os flavonóides, necessários para ativação dos genes nod são reduzidos pela acidez mesmo quando as estirpes utilizadas são tidas como tolerantes.

2.1 Mecanismos que determinam a tolerância de rizóbio ao estresse causado pelo pH baixo

Os mecanismos fisiológicos determinados geneticamente garantem a adaptação das estirpes aos estresses causado pelo pH baixo. Na tentativa de estabelecer os efeitos dos exopolissacarídeos extracelulares (EPS) sobre pH da solução e atividade de alumínio, Cunningham e Munns (1984a) estudaram isolados de seis gêneros de hospedeiros (*Cicer*, *Phaseolus*, *Leucaena*, *Lens*, *Melilotus* e *Trifolii*) quanto a capacidade de crescer em meio ácido sólido (pH 4,2 a 6,4) e encontraram em 20 isolados de *Rhizobium phaseoli* uma correlação positiva entre EPS produzido e tolerância a acidez. Num segundo experimento, a capacidade tampão e de quelação dos EPS variou consideravelmente entre estirpes, mas não correlacionou-se com a tolerância a acidez das estirpes isoladas, embora as estirpes tolerantes tenham produzido mais EPS do que as sensíveis (Cunningham e Munns, 1984b). Os autores especularam que os EPS poderiam modificar o meio ambiente, diminuindo os estresses causados pela acidez do solo. Assim, embora a quantidade de EPS das diferentes estirpes varie significativamente na capacidade tampão e de quelação, EPS não parece conferir

tolerância a acidez a uma estirpe pelo tamponamento do pH ou do alumínio. Outras possíveis causas das relações entre tolerância a acidez e produção de EPS poderiam ser a inclusão do aumento da concentração de P em solução e/ou a necessidade de aumento de EPS para ligação das lectinas num ambiente ácido.

O fósforo, assim como o cálcio, é citado em vários trabalhos (Reeve et al., 1993; Hartel e Alexander, 1983; Thornton e Davey, 1983) por desempenharem um importante papel na sobrevivência de rizóbio aos estresses causados pela acidez. O cálcio está envolvido em muitos processos celulares como estabilidade da parede celular, complexo peptino-glicano (Maagd, Wientjes, Lugtenberg, 1989) e quimiotaxia (Broek e Vanderleyden, 1995). Segundo Vincent (1962) em torno de $25\mu\text{M}$ de Ca em meio líquido são suficientes para um crescimento normal *Rhizobium meliloti*, entretanto, sob condições de pH baixo (pH 5,7) há necessidade de se aumentar esse valor para 10 a 100 (200 a 2000 μM) vezes mais, para que resulte em aumento da taxa de crescimento (Watkin, O'Hara e Glenn, 1997; Reeve et al., 1993; Howieson, Robson e Abbott, 1992).

Segundo Aarons e Graham (1991), estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tolerantes a pH baixo (4,6) têm maiores teores de cálcio do que as estirpes sensíveis, enquanto O'Hara et al. (1989) demonstraram que estirpes de *Rhizobium meliloti* tolerantes a acidez necessitam de menores teores de cálcio do que estirpes sensíveis. O potássio é considerado um elemento importante na manutenção do pH citoplasmático (Booth, 1985). Assim, em estirpes tolerantes a pH baixo, é encontrado em teores maiores do que nas sensíveis, sendo esses teores elevados quando as estirpes tolerantes são expostas a pH baixo (Aarons e Graham, 1991).

Quando microrganismos crescem em condições levemente ácidas (pH 5,6 a 5,8), sendo posteriormente expostos a baixos valores de pH (3,5 a 4,0), sua sobrevivência à nova condição é significativamente maior do que se fossem

previamente crescidos em condições ótimas (pH 7,0). Esse fenômeno é denominado de “acid habituation” (Goodson e Rowbury, 1989a, 1989b) ou adaptative tolerance response (ATR) (Dilworth et al., 1999; O’Hara et al., 1989). Assim como em bactérias entéricas (Fabber e Pagatto, 1992; Foster e Hall, 1991), em rizóbio (O’Hara e Glenn, 1994) ATR envolve a síntese de várias proteínas resultantes do choque provocado pela acidez, as quais auxiliam a membrana externa na recuperação dos fosfolipídeos, evitando os efeitos danosos da acidez (Correa e Barnex, 1997)

Leyer e Johnson (1993) e Farber e Pagotto (1992) demonstraram que proteínas sintetizadas durante adaptação a acidez também promoveram resistência à temperatura, à salinidade, sistema lactoperoxidase e agentes que atuam sobre a superfície celular, como cristal violeta cuja absorção depende da permeabilidade da membrana, e polimicina B, um antibiótico peptídeo catiônico que causa a ruptura da membrana quando interage com um lipídeo chamado fosfatidiletanolamina (HsuChen e Feingold, 1973).

A maioria dos principais grupos de microrganismos tem representantes que crescem em valores de pH extremamente baixos (Langworth, 1978). Tem sido relatado para vários acidófilos e neutrófilos, que a manutenção do pH citoplasmático próximo a neutralidade parece ser necessária para que a bactéria cresça em pH baixo (Booth, 1985; Langworth, 1978). Assim, existem menções de que o crescimento de *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum* com diferentes valores críticos de pH pode ser totalmente inibido em meios laboratoriais a valores de 0,1 a 0,2 unidade de pH abaixo do seu pH crítico individual (Lowendorf e Alexander, 1983a, 1983b; Richardson e Simpson, 1989; Richardson et al. 1988; Reeve et al., 1993). Isto explica porque a regulação do pH citoplasmático desempenha um papel crucial na tolerância a acidez em bactéria.

Resultados obtidos por O'Hara et al. (1989) demonstraram que estirpes de *Rhizobium meliloti* tolerantes a acidez podem produzir um alto gradiente de pH quando crescidas em condições de elevada acidez, podendo manter o pH citoplasmático alcalino relativamente constante, indicando que a capacidade de *Rhizobium* em tolerar acidez é correlacionada com sua capacidade de controle do pH citoplasmático. De acordo com Chen, Richardson e Rolfe (1993), a limitada capacidade de regular o pH citoplasmático de mutantes *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sensíveis a acidez (AS25 e AS28) devem-se ao aumento na permeabilidade da membrana, resultando em imediato efluxo de cálcio.

O'Hara e Glenn (1994) sugeriram a utilização do tempo de redução decimal (D, tempo necessário para redução de 90% da população) para comparar a sobrevivência de células cultivadas sob as condições dos estresses causados pelo pH excessivamente baixo. Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* (WU 95, 3001 e WSM 710) têm valores D iguais a 1, 6 e 5 minutos, respectivamente, quando crescidos em pH 7,0 e valores D iguais a 5, 20 e 12 minutos, respectivamente, quando crescidos em pH 5,0. Já a fase exponencial de células de *Rhizobium tropici* UMR 1899, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 e *Bradyrhizobium* sp NC 92 foram mais tolerantes ao estresse ácido com valores D iguais a 31, 35 e 42 minutos quando crescidas em pH 7,0 e valores D iguais a 56, 86 e 68 minutos quando em pH 5,0. Culturas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 3001 ou *Escherichia coli* UB 1301, quando cultivadas em pH 7,0 e transferidas para pH 5,0, cresceram imediatamente e induziram a tolerância a acidez em apenas uma geração.

2.2 Produção de inoculantes

A soja é a leguminosa de maior expressão econômica no Brasil com uma produtividade em torno de 30 milhões de toneladas de grãos (safra 1998/1999).

Esse grande sucesso deve-se à fixação biológica de nitrogênio realizada por estirpes do gênero *Bradyrhizobium* spp e ao exaustivo trabalho dos pesquisadores na seleção de estirpes eficientes para compor os inoculantes comerciais.

No Brasil, as estirpes de rizóbio utilizadas na produção de inoculantes são recomendadas pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE). O principal critério usado na seleção de estirpes de rizóbios para a produção de inoculantes comerciais é a capacidade de estabelecer uma simbiose com a planta de interesse, devendo esta ser efetiva e capaz de fixar nitrogênio atmosférico para manter ou aumentar a produtividade de grãos em quantidades comparáveis àquelas que seriam obtidas com o uso de fertilizantes nitrogenados.

A turfa constitui-se no veículo padrão utilizado para produção de inoculantes de rizóbio (Crawford e Berryhil, 1983; Smith, 1992; Fouilleux, Revellin e Catroux, 1994) por apresentar características desejáveis como alta retenção de água, granulometria fina e alta porcentagem de matéria orgânica. Os inoculantes para soja, em sua maioria, são preparados com turfa finamente moída e com pH corrigido para 6,8 a 7,0.

Problemas com a qualidade dos inoculantes comerciais têm sido freqüentes e podem ser atribuídos principalmente ao uso de turfa não desinfestada (Gomez et al., 1997; Brockwell e Bottomley, 1995), tanto no Brasil como no exterior. Entretanto, pela últimas mudanças na lei de regulamentação dos inoculantes comerciais brasileiros, ficou estabelecido que o material utilizado como veículo na produção do inoculante deverá ser desinfestado (VII RELARE, 1996). No caso do controle de qualidade, os inoculantes devem chegar às mãos do agricultor com uma população mínima de células por g ou ml de inoculante de 10^8 , estando isentos de contaminantes até a diluição 10^{-5} (VIII RELARE, 1998).

No solo, as células de rizóbio sobrevivem de forma saprófita, multiplicando-se rapidamente quando encontram fonte de carbono e são umedecidas pelas águas das chuvas. Entretanto, a baixa disponibilidade desses dois fatores essenciais é comum em solos agrícolas. Os inoculantes produzidos a partir de meios de cultura rico em nutrientes e com pH próximo a neutralidade podem sofrer perda de viabilidade quando adicionados diretamente ao solo com pH baixo e desequilíbrio nutricional (Dilworth et al., 1999; Clarke, Dilworth e Glenn, 1993).

A utilização de estirpes com capacidade de crescer em meios de cultura com valores de pH ácido e/ou levemente ácido na produção de inoculantes comerciais foi sugerida por Keyser e Munns (1979a, 1979b) e sustentada por muitos outros (Clarke, Dilworth e Glenn, 1993), embora raros trabalhos (Howieson e Ewing, 1986; Howieson, Ewing e D'Antuono, 1988) tenham feito uso de estirpes tolerantes a acidez para inoculantes ou modificaram o pH do meio de cultivo do inoculante (Barberi e Moreira, 1994). Atualmente, pesquisas visam a construção de estirpes tolerantes a pH baixo com o uso da engenharia genética (Glenn et al., 1997; Chen, Richardson e Rolfe, 1993). A utilização dessas ou de estirpes selecionadas a partir de populações nativas em inoculantes com pH corrigido para valores de pH baixo para cultura da soja até o momento não foi testada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, constando de dois experimentos *in vitro* e um em casa de vegetação.

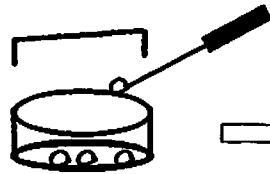
3.1 Estirpes estudadas

Foram estudadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium*: duas características de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e Br 29) lançadas como estirpes inoculante em 1968 e 1979, respectivamente, que são eficientes na simbiose com *Glycine max* (soja) e consideradas competitivas em solos de Cerrado (Peres e Vidor, 1980). A estirpe Br 4406, classificada como *Bradyrhizobium japonicum* (Moreira, Haukka e Young, 1998), microsimbionte de *Enterolobium contortisilyquum*.(Vell) Morong (tamboril), vem se destacando pela produção de polissacarídeos e principalmente, pela tolerância a acidez (Ribeiro Jr., Franco e Lopes, 1986) e a metais pesados (Trannin, 1999; Matsuda, 2000). A INPA 03-11b (igual a SMS 139), isolada de *Centrosema* sp em solos de terra firme da Amazônia, é eficiente em *Vigna unguiculata* (feijão caupi) (Magalhães, 1986) e até o momento não tem definição quanto a espécie.

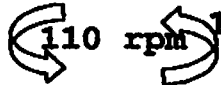
3.2 Comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* spp crescidas em meio líquido com diferentes valores de pH

Para avaliar o comportamento das estirpes crescidas em meio líquido com diferentes valores de pH, colônias isoladas de cada uma foram obtidas em meio YMA (yeast manitol agar) (Vincent, 1970) e inoculadas em erlenmeyer contendo 250 ml de meio YM com pH 5,0; 6,0 e 6,9 ajustado com solução de HCl 2N e colocadas a crescer sob agitação orbital a 110 rpm a 28°C

Obtenção de colônias isoladas



5 mL

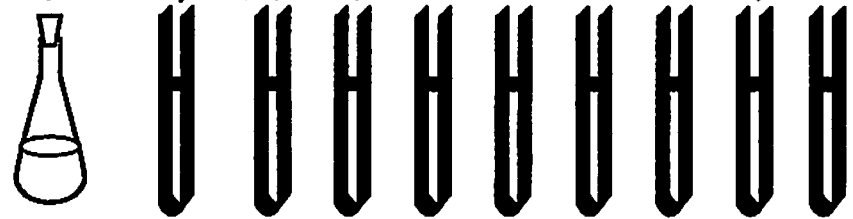


Leitura da densidade ótica a 560nm

Tubos com 9 ml de solução salina (0,55%)

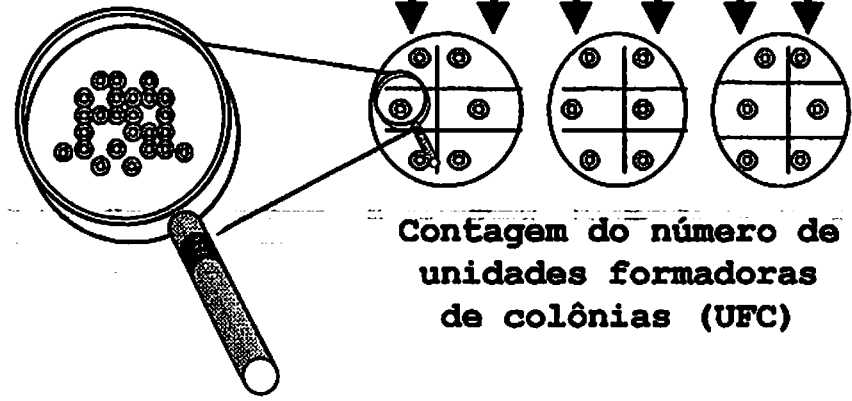
1ml

1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml



10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9}

20 μ l



Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

FIGURA 1: Diagrama esquemático do cultivo das estirpes de *Bradyrhizobium*

(estabelecido com base em experimentos prévios). A partir de 48 horas de crescimento e a cada 24 horas, foram realizadas avaliações retirando-se alíquotas de 5 ml da cultura para determinação da densidade ótica a 560 nm e inoculação em placa pelo método de diluições sucessivas para contagem do número de unidade formadoras de colônias (UFC) (Figura 1) (Miles e Misra, 1938)

O número de UFC foi calculado por contagem direta do número de colônias nas placas em cada diluição, sendo obtidas equações de regressão pela relação do logaritmo do número de UFC por mililitro de meio de cultura em função do tempo e da densidade ótica. Assim, por esta última, pode-se comparar a produção de polissacarídeos entre as estirpes, tomando-se o número base de $10^{8.8}$ UFC ml⁻¹ para todas as estirpes. Esse número foi determinado na fase log, na tentativa de se obter maior número de células viáveis, diminuindo, assim, a interferência da fase estacionária (morte celular) nas leituras de densidade ótica.

3.3 Resposta da soja a inoculantes produzidos com estirpes cultivadas em diferentes valores de pH

Este experimento teve por objetivo estudar o efeito de inoculantes produzidos com estirpes de *Bradyrhizobium* crescidas em diferentes valores de pH, na nodulação e no crescimento de plantas de soja da variedade CAC-1 cultivadas em casa de vegetação. O experimento constou de um delineamento inteiramente casualizado com quatro estirpes, três valores de pH (5,0; 6,0 e 6,9) com cinco repetições, além de um tratamento testemunha com nitrogênio e outro sem nitrogênio e na ausência de inoculação. Para o tratamento com nitrogênio foi utilizado NH₄NO₃ como fonte de N, fornecendo 200 mg N dm⁻³ de solo.

Para produção dos inoculantes, curvas de regressão obtidas no primeiro experimento foram utilizadas para padronizar o número de células a serem inoculadas em cada tratamento.

O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Amarelo (LA), textura argilosa fase cerrado, coletado na camada de 0 a 20 cm de profundidade, seco ao ar e peneirado em malha de 5,0 mm. Análises químicas e físicas, seguindo-se metodologia proposta por Vettori (1969) e modificada pela EMBRAPA (1979) e Camargo et al. (1986) encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Características químicas e físicas do solo utilizado.

Características		Valores
Alumínio	cmolc/dm ³	0,0
Cálcio	cmolc/dm ³	1,1
Magnésio	cmolc/dm ³	0,6
Potássio	mg/dm ³	75
Fósforo	mg/dm ³	1,0
pH	em água	5,5
Ac. potencial	cmolc/dm ³	4,0
Soma de bases	cmolc/dm ³	1,9
CTC efetiva	cmolc/dm ³	1,9
CTC a pH 7,0	cmolc/dm ³	5,9
Sat. bases	%	32,2
Sat. alumínio	%	0,0
Ferro	mg/dm ³	156,2
Zinco	mg/dm ³	5,4
Cobre	mg/dm ³	4,1
Matéria orgânica	dag/kg	3,71
Carbono	dag/kg	2,15
Areia	g/kg	560
Argila	g/kg	190
Silte	g/kg	250

*extratores: Ca, Mg e Al = KCl 1N; P e K = Mehlich I; (H+Al) = acetato de cálcio 1N a pH 7,0; Mn, Fe, Zn e Cu = DTPA.

A necessidade de calagem foi suprida adicionado-se calcário dolomítico de modo a elevar o índice de saturação de bases para V= 60%. O solo foi incubado por 15 dias, com teor de água em torno de 70% do volume total de poros (VTP). Passado o período de incubação, o solo foi seco ao ar e

aconditionado em vasos de tubo de PVC com capacidade de 1,4 dm³. Para suprir a deficiência em nutrientes minerais, uma solução nutritiva foi adicionada, contendo 200 mg kg⁻¹ de P; 300 mg kg⁻¹ de K; 30 mg kg⁻¹ de Mg; 50 mg kg⁻¹ de S; 0,5 mg kg⁻¹ de B; 1,5 mg kg⁻¹ de Cu; 0,1 mg kg⁻¹ de Mo e 5 mg kg⁻¹ de Zn. O potássio foi parcelado em 3 aplicações iguais, uma no plantio e as outras aos 20 e 35 dias após a emergência das plântulas.

As plantas foram coletadas durante o período da floração, sendo a parte aérea cortada na altura do colo. O sistema radicular e os nódulos foram retirados cuidadosamente (evitando-se destacamento dos nódulos das raízes) do torrão formado para medir a atividade da enzima nitrogenase pelo método de redução de acetileno (Dilworth, 1966) em raízes intactas. Para isso, as raízes foram colocadas em frascos de 500 ml com tampa rosqueada e rolha de borracha, por onde foram retirados 10% do volume em ar da atmosfera do frasco e injetado o mesmo volume de acetileno (C₂H₄). Após incubação por duas horas, procedeu-se injeção de 1 ml da amostra gasosa em cromatógrafo a gás. Então, os nódulos foram destacados manualmente do sistema radicular, contados e colocados para secar em estufa com circulação de ar a 60° - 70°C, para determinação da massa seca de nódulos, raízes e parte aérea.

3.4 Sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* spp cultivadas em inoculante turfoso com diferentes valores de pH

Para avaliar o efeito do pH da turfa na sobrevivência das estirpes, estas foram cultivadas em YM com pH ajustados para 6,0 e 6,9, até a obtenção de cerca de 10⁹ células ml⁻¹ e misturadas à turfa corrigida para valores de pH correspondentes.

A turfa utilizada foi cedida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) – EMBRAPA, local onde foi seca ao ar, passada em peneira de 200 mesh e analisada quimicamente (Tabela 2).

TABELA 2. Análise química da turfa

% N	% C	pH	cmol/dm ³				mg/dm ³		
			Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K	Na
0,57	16,04	3,6	0,3	12	8,0	4,0	89	610	68

Para correção da turfa, foi realizada uma curva de incubação com 1, 2, 3, 4, 5 e 6% de carbonato de cálcio (CaCO₃) (Figura 2). Assim, foram adicionados 3,0 e 4,3% (v/v) de carbonato de cálcio para pH 6,0 e 6,9, respectivamente.

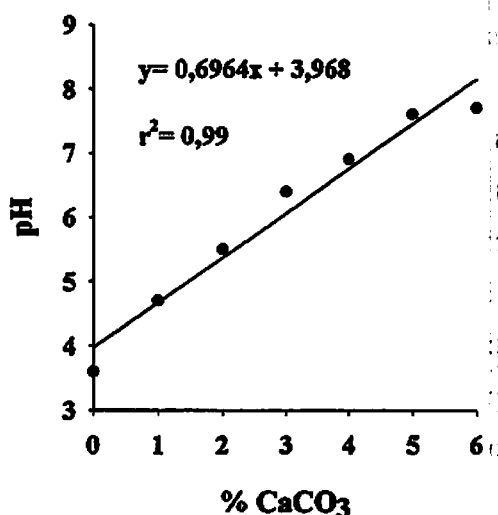


FIGURA 2. Curva de neutralização da turfa

Porções de 5 g de turfa corrigida foram colocadas em sacos de polipropileno (10 x 15 x 0,06 cm), os quais foram lacrados em seladora a quente e autoclavados por duas vezes, durante uma hora a 121°C em intervalos de 24 horas (Sparrow e Ham, 1983). Com o uso de seringas estéreis, 2 ml de cultura bacteriana com $\pm 10^9$ de células ml⁻¹ de meio foram injetadas nos sacos de polipropileno. O local da perfuração foi limpo com algodão estéril embebido em álcool etílico hidratado e coberto com fita adesiva autoclavada. Manualmente,

cada pacote (total =90 pacotes) foi agitado vigorosamente para garantir a completa homogeneidade do inoculante que foi posteriormente armazenado sob temperatura de 28° - 30°C (Figueiredo, Stamford e Burity, 1991).

Após 15, 30, 45, 60 e 75 dias da inoculação, foram realizadas as avaliações do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Para isso, as 5g do inoculante foram colocadas em erlenmeyer contendo 95 mL de solução salina (0,55%) e agitadas por um minuto, seguindo-se as diluições sucessivas em tubos com 9 ml da mesma solução (Vincent, 1970). Aliquotas de 0,02 ml a partir da diluição 10^{-4} até 10^{-9} foram inoculadas em placas com meio YMA e incubadas a 28°C durante sete dias.

3.5 Cálculo e análises estatísticas

Para todos os ensaios, após análise de variância, os dados foram comparados entre tratamentos pelo teste de Duncan ($p > 0,05$), empregando-se o Sistema de Análise Estatísticas e Genéticas (SAEG 5.0), sendo também realizada, para os ensaios de comportamento em meio líquido e sobrevivência em turfa, a regressão pelo programa TableCurve 3.01 (Jandel Corporation). O valor de F foi calculado e testado pelo programa FCalc 32 versão 1.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* spp crescidas em meio líquido com diferentes valores de pH

O comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi diferenciado pelo pH de cultivo, sendo que todas as estirpes cresceram melhor em pH 6,0 (Figura 3), onde alcançaram os maiores números de unidade formadoras de colônias.

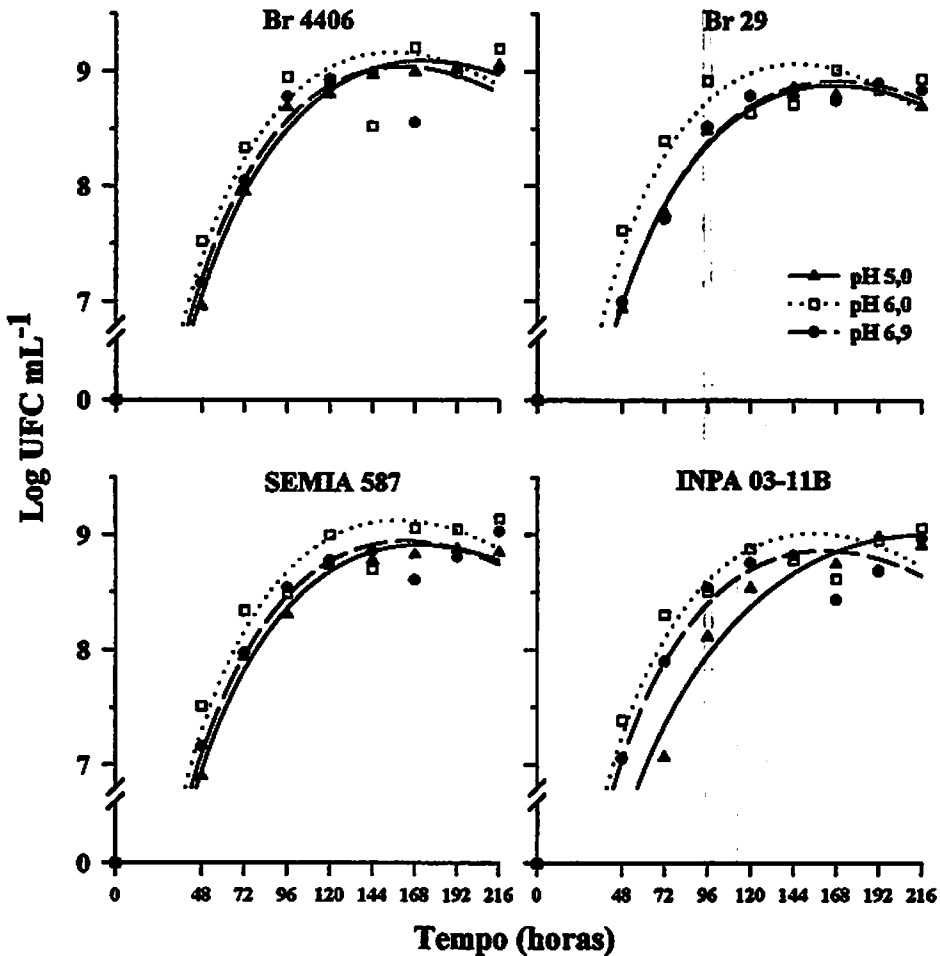


FIGURA 3. Comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido em função do pH de cultivo

Em pH 5,0, a estirpe INPA 03-11b apresentou um crescimento menor em relação a pH 6,0 e 6,9 até 168 horas. A partir desta, o crescimento foi semelhante, chegando a superar os demais valores de pH testados. Esta diferença nas primeiras horas de crescimento pode ser devida a uma maior inibição do crescimento na fase lag, proporcionada pela acidez mais elevada, indicando que a tolerância ao pH baixo é dependente da fase de crescimento (Correa e Barnex, 1997; O'Hara e Glenn, 1994). Thornton e Davey (1983) e Keyser e Munns, (1979a, 1979b) também observaram um aumento da fase lag em estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido (pH 4,5). Já as estirpes Br 4406, Br 29 e SEMIA 587 tiveram comportamento semelhante em pH 5,0 e 6,9.

O tempo necessário para atingir crescimento máximo, obtido por meio das equações de regressões (Figura 3), também foi menor em pH 6,0, sendo de 146 horas para Br 4406, 143 para Br 29, 155 para SEMIA 587 e 148 para INPA 03-11b (Tabela 3), indicando uma melhor adaptação das estirpes *Bradyrhizobium* estudadas ao pH levemente ácido. Os número de UFC para pH 5,0, em geral foram semelhantes em relação ao pH 6,9, porém, o tempo necessário para crescimento máximo foi diferenciado, exceto para SEMIA 587.

TABELA 3. Tempo necessário para o crescimento máximo de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* em diferentes valores de pH.

pH	Estirpes							
	Br 4406		Br 29		SEMIA 587		INPA 03-11B	
	tempo(h)	UFC	tempo(h)	UFC	tempo(h)	UFC	tempo(h)	UFC
5,0	165,38	9,09	159,47	8,88	161,16	8,91	210,09	9,00
6,0	145,97	9,16	143,44	9,07	155,25	9,13	147,66	9,01
6,9	153,56	9,04	165,38	8,92	161,16	8,95	151,88	8,86

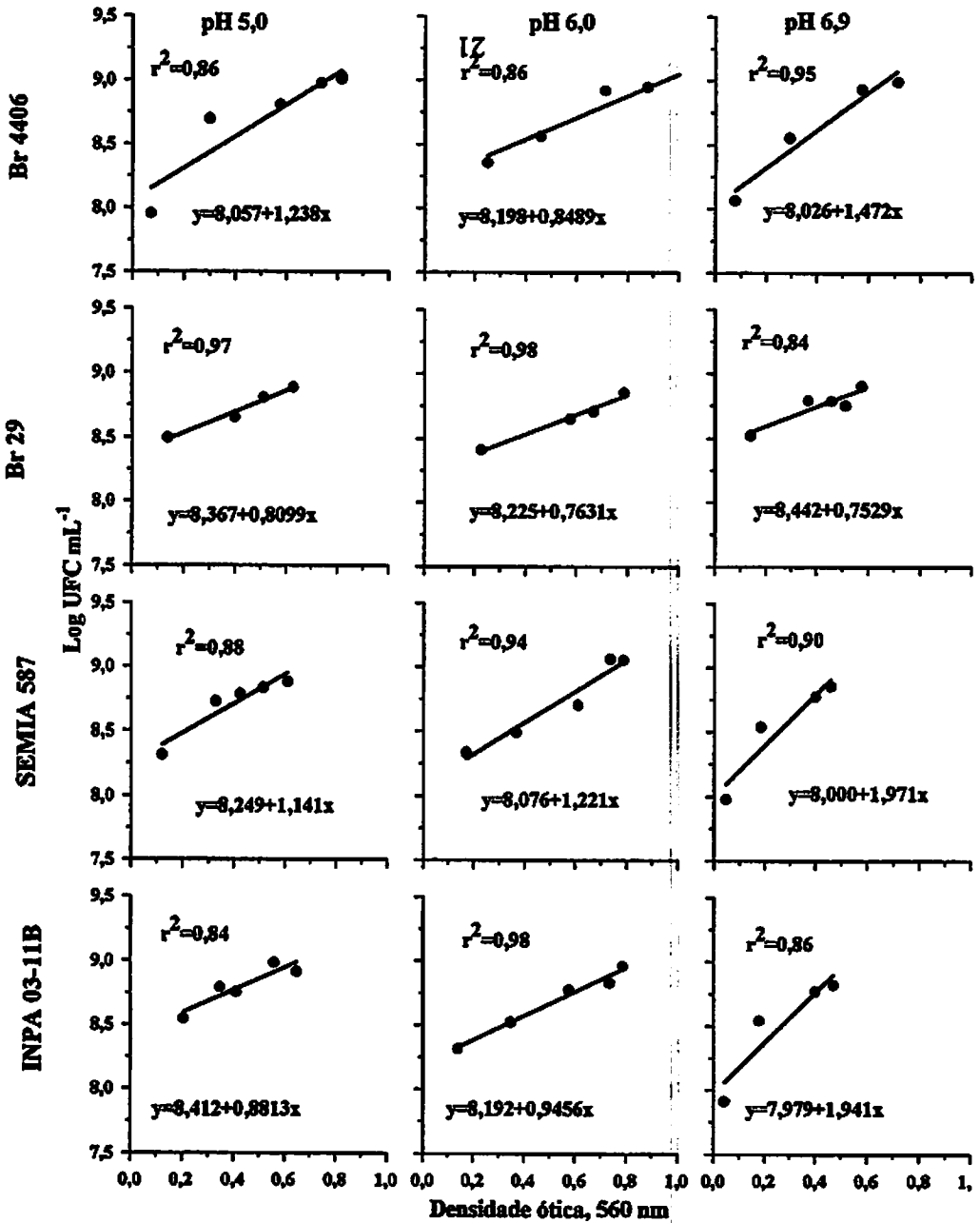
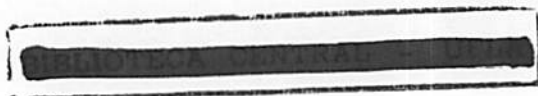


FIGURA 4. Relação entre o Log de UFC em função da densidade ótica das estirpes de *Bradyrhizobium*.



A densidade ótica é a resultante do número de células somado à produção de exopolissacarídeos. Tomando-se como base um mesmo número de UFC para todas as estirpes na fase log e fazendo-se uso das equações de regressão da Figura 4, foram obtidas densidades referentes apenas à produção de polissacarídeos. A produção de exopolissacarídeos foi diferenciada entre estirpes em função do pH de cultivo, sendo as maiores quantidades obtidas em pH 6,0 (Figura 5).

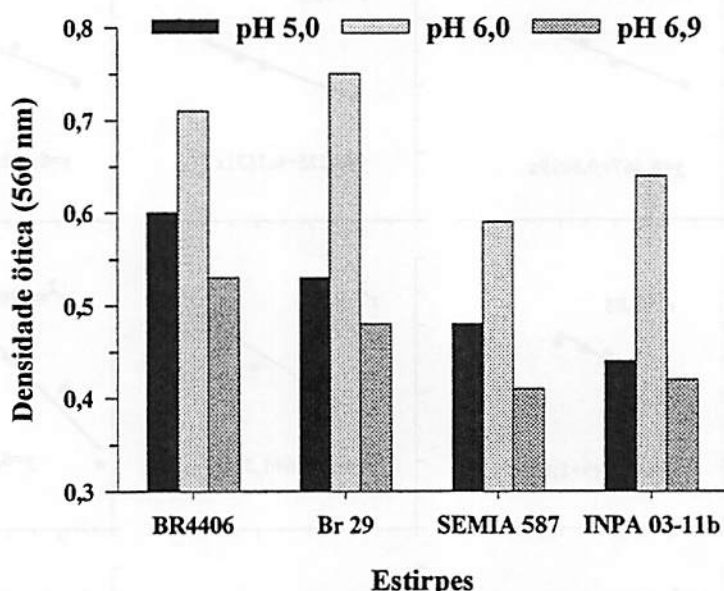


FIGURA 5. Densidade ótica de estirpes de *Bradyrhizobium* em $10^{8,8}$ UFC mL⁻¹ em função do pH de cultivo.

Em pH 5,0 e 6,9, a estirpe Br 4406 que apresentou, de modo geral, maior número de UFC em relação às demais, também apresentou uma maior produção de exopolissacarídeos. Esses resultados estão em acordo com a proposta de Cunningham e Munns (1984a) de que a produção de polissacarídeos está associada a maior tolerância a acidez. Entretanto, de acordo com Neves et al. (1992) isolados de Br 33 (*B. japonicum*), após adaptação a condições de acidez a campo, diminuíram a quantidade de exopolissacarídeos. Segundo

Graham et al. (1982), o acúmulo de exopolissacarídeos é o resultado da incompleta síntese da membrana externa. Assim, a produção de exopolissacarídeos é um investimento significativo em termos de gasto de energia que, sob condições de estresse de prótons, as células têm mais urgência no uso em outras funções destes carboidratos (Dilworth et al., 1999). Estes mesmos autores sugerem ainda que o fenômeno da "acid habituation", o qual envolve a síntese de várias proteínas, principalmente proteínas da membrana externa e o controle do pH citoplasmático, que proporcionariam resistência à perda de nutrientes necessários à manutenção destes sistemas. Assim, num cultivo subsequente, as células crescidas em pH baixo poderão produzir um maior número de UFC do que aquelas crescidas em pH 7,0.

Os resultados deste experimento demonstram, desta forma, um comportamento diferenciado das estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido com pH baixo, tanto em número de UFC quanto em produção de exopolissacarídeos. O melhor desempenho em pH 6,0 apresentado pelas estirpes estudadas pode estar relacionado a uma resposta adaptativa ao meio levemente ácido, e a produção de exopolissacarídeos.

4. 2 Resposta da soja a inoculantes produzidos com estirpes cultivadas em diferentes valores de pH

O número de nódulos (NN), atividade da nitrogenase (Nase), massa seca de nódulos (MSN), raízes (MSR) e parte aérea (MSPA) de plantas de soja inoculadas com quatro estirpes de *Bradyrhizobium* crescidas em diferentes valores de pH mais os tratamentos com e sem nitrogênio, encontram-se na Tabela 4.

A produção de MSPA e MSR, em geral, não diferiu entre as estirpes Br 29, SEMIA 587 E INPA 03 -11b e os tratamentos com e sem nitrogênio, independente do pH de cultivo. As maiores produções ocorreram no tratamento

com nitrogênio, não diferindo da estirpe SEMIA 587 cultivada no pH 6,9, coincidindo também com os maiores resultados para matéria seca da parte aérea nos mesmos tratamentos. As plantas inoculadas com a estirpe Br 4406 tiveram as menores produções, evidenciando a ineficiência desta estirpe na simbiose com soja.

TABELA 4. Número de nódulos, atividade da nitrogenase, massa de nódulos secos, massa da parte aérea seca e massa de raízes secas de plantas de soja inoculada imediatamente com estirpes de *Bradyrhizobium* spp crescidas em diferentes valores de pH, bem como plantas não inoculadas com e sem adubação com nitrogênio.

pH	Tratamentos Estirpe	Número de nódulo	Atividade/ Nitrogenase $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$	Massa seca		
				Nódulo	Raiz	P. aérea
5,0	Br 4406	2 e	83 cd	0,01 c	1,64 d	3,2 e
6,0		1 e	12 d	0,00 c	1,63 d	2,9 e
6,9		1 e	43 cd	0,01 c	1,72 d	3,4 de
5,0	Br 29	55 abc	1.663 a	0,16 b	1,63 d	4,1 bc
6,0		62 a	2.114 a	0,19 ab	1,85 cd	4,4 bc
6,9		57 ab	2.437 a	0,19 ab	1,84 cd	4,7 ab
5,0	SEMIA 587	43 cd	223 bc	0,18 ab	1,81 cd	4,3 bc
6,0		49 abc	220 bc	0,19 ab	1,83 cd	4,5 ab
6,9		48 abc	657 b	0,24 a	2,24 ab	5,1 a
5,0	INPA 03-11b	44 bcd	1.662 a	0,18 ab	1,84 cd	4,6 ab
6,0		36 d	1.566 a	0,24 a	2,16 abc	4,6 ab
6,9		58 a	1.642 a	0,18 ab	1,83 cd	4,4 bc
Com N		0 e	0 cd	0,00 c	2,40 a	4,8 ab
Sem N		0 e	0 cd	0,00 c	1,98 bcd	3,9 cd

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Para as variáveis MSN e NN, as estirpes Br 29, SEMIA 587 e INPA 03-11b não variaram, independente do pH de cultivo, estando tais valores de acordo

com aqueles encontrados por Peres et al. (1993); Oliveira, Ramos e Duque (1991) e Morote et al. (1990) para estas variáveis. Segundo Vargas e Suhet (1980) e Vargas, Peres, Suhet (1982), para uma simbiose eficiente, uma planta de soja na época de florescimento deve apresentar entre 15 e 30 nódulos ou 100 a 200 mg de nódulos secos.

Os menores valores para NN e MSN foram observados nos tratamentos com a estirpe Br 4406, recomendada como sendo de eficiência comprovada quando inoculada em *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) (Ribeiro Jr., Franco e Lopes, 1986), capaz de crescer em meio de cultura com elevada acidez (Ribeiro Jr., Lopes e Franco, 1987; Miguel, Moreira e Siqueira, 1998). Esses baixos NN podem ser devido, provavelmente, à alta especificidade hospedeira apresentada pela soja. Algumas cultivares de soja apresentam um grau considerável de especificidade quando inoculadas com determinadas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (Vidor et al., 1983). A especificidade hospedeira é a habilidade de uma estirpe de rizóbio em promover a nodulação em espécies, variedades e/ou cultivares de soja, mas com um certo grau de seletividade (Peres e Vidor, 1980; Vidor et al., 1983). Porém, é interessante observar que a estirpe INPA 03-11b, isolada de *Centrosema* sp de solo ácido da Amazônia e eficiente para *Vigna unguiculata* (feijão caupi), mas que até o momento não havia sido testada quanto a sua eficiência em soja, apresentou uma resposta semelhante às estirpes já recomendadas, Br 29 e SEMIA 587.

A atividade da Nase foi maior para as estirpes Br 29 e INPA 03-11b, não diferindo entre si e os tratamentos de inoculação. Os tratamentos com a estirpe SEMIA 587 diferiram de Br 29 e INPA 03-11b, apresentando, juntamente com Br 4406, menores atividade da Nase. Para esta última, os tratamentos com pH 5,0 e 6,9 foram semelhantes aos tratamentos pH 5,0 e 6,0 da SEMIA 587.

Embora exista uma correlação positiva entre número ($r = 0,77$) e massa de nódulos secos ($r = 0,76$) e a atividade da nitrogenase, nem sempre os

tratamentos que promoveram as maiores atividade de Nase apresentaram maior MSPA e MSR.

O resultados deste experimento demonstraram o efeito da inoculação nas variáveis analisadas, embora, em geral, não tenham sido foram observadas diferenças em função da inoculação com estirpes crescidas nos diferentes valores de pH. Possivelmente, o principal fator responsável pela falta de resposta nos diferentes tratamentos de inoculação pode ser devido à não correção da turfa para os valores de pH correspondentes ao do meio de cultivo neste experimento. De qualquer forma, os resultados demonstram que o uso do pH 6,0 no meio de cultivo de rizóbio utilizado para produção do inoculante em turfa não compromete a eficiência simbiótica.

4.3 Sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* spp cultivadas e inoculadas em turfa com diferentes valores de pH

Na Tabela 5, encontram-se os valores de UFC das estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas e inoculadas em turfa com diferentes valores de pH.

A sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* foi reduzida com o aumento do tempo de armazenamento, sendo este dependente do pH de cultivo. Houve um crescimento de todas as estirpes, logo nos primeiros 15 dias de armazenamento onde alcançaram máximos números de UFC nos dois valores de pH, permanecendo semelhantes em pH 6,9 até os 45 dias, exceto para Br 4406, que apresentou crescimento até os 30 dias. Em pH 6,0, a estirpe Br 29 foi a única que manteve-se com números máximos até os 60 dias, enquanto Br 4406, SEMIA 586 e INPA 0311-b decresceram, respectivamente, a partir de 45, 30 e 30 dias.

Segundo Somasegaran, Reyes e Hoben (1984), este aumento é um período de maturação também chamado de "cura", que ocorre devido à utilização de nutrientes ainda presentes no meio de cultura. Passado esse

período, a população tende a decrescer e começa se estabilizar, dependendo das condições.

TABELA 5. Unidades Formadoras de Colônias (Log UFC, g⁻¹) de estirpes de *Bradyrhizobium* spp em função do pH do meio de cultura e da turfa em cada período de armazenamento.

Estirpe	pH	Período (Dias)					
		(0)	15	30	45	60	75
		Log UFC g ⁻¹					
Br 4406	6,0	8,06 Ac ⁽¹⁾	8,78 Bc ⁽²⁾	9,08 Bb	9,32 Ba	8,93 Bbc	8,48 Ad
	6,9	7,81 Be	9,66 Aab	9,81 Aa	9,56 Abc	9,46 Ac	8,60 Ad
Br 29	6,0	8,06 Ac	9,85 Aa	9,71 Bab	9,61 Aab	9,67 Aab	9,44 Ab
	6,9	8,19 Ac	9,87 Aa	9,97 Aa	9,82 Aa	8,82 Bb	8,92 Bb
SEMIA 587	6,0	7,95 Ac	9,83 Aa	9,70 Bab	9,41 Bc	9,53 Abc	9,20 Ad
	6,9	8,01 Ac	9,99 Aa	10,06 Aa	9,96 Aa	9,14 Bb	9,07 Ab
INPA 03-11b	6,0	7,95 Ad	9,86 Aa	9,73 Aa	9,46 Bb	9,22 Abc	9,15 Ac
	6,9	8,03 Ac	10,04 Aa	10,06 Ba	9,93 Aa	9,17 Ab	8,98 Ab

(1) Valores de UFC calculados a partir da relação entre o log de UFC e a densidade ótica

(2) Médias de UFC seguidas pela mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Em relação aos valores de pH de cultivo e de correção da turfa, percebe-se que os números de UFC iniciais calculados a partir da relação entre Log de UFC e a densidade ótica (Figura 4) não diferiram, exceto para Br 4406 que, ao longo do período de armazenamento, apresentou menores números de UFC em pH 6,0 em relação a pH 6,9 até 60 dias, embora os números de UFC iniciais fossem maiores. Porém, aos 75 dias, não houve diferença entre os dois valores de pH para esta estirpe. Um dos destaques dessa estirpe é a produção de exopolissacarídeos sob estresse (Figura 5). Segundo Dilworth et al. (1999), sob condições de pH baixo, a produção de exopolissacarídeos pode se tornar mais

um fator de estresse. Entretanto, considerando-se que este pode ser um fator de adaptação a acidez, o investimento em exopolissacarídeos como forma de tolerância a pH baixo, parece ser o mecanismo que, ao final dos 75 dias, garante números de UFC semelhante nos valores de pH.

De modo geral, as estirpes mantiveram a tendência de maiores números de UFC em pH 6,9 até 45 dias. Ao final dos 75 dias não diferiram, exceto para Br 29 que sobreviveu melhor em pH 6,0. Assim, os menores números de UFC em pH 6,0 ao longo de determinado período de armazenamento podem ser devidos a uma pré-adaptação ao pH levemente ácido (acid habituation), durante o cultivo em pH 6,0. Somando-se a isso, o efeito da concentração de cálcio varia com o pH, entretanto, aumentando-se a concentração de cálcio ocorre um aumento em termos de sobrevivência celular (Dilworth et al., 1999). A taxa de crescimento é estimulada pela presença do cálcio, sendo este efeito maior quando as células de rizóbio estão sob estresse provocado pela acidez (Howieson, Robson e Abbott, 1992; Reeve et al., 1993). Assim, embora a quantidade de cálcio usada para corrigir a turfa para pH 6,9 seja maior, a concentração de cálcio tem efeito menor sobre pH alcalino e neutro.

Os resultados desses experimentos demonstram que o pH de cultivo e de correção da turfa influenciam na sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* e mostram a possibilidade do uso de inoculantes corrigidos para valores de pH 6,0, como modo de pré-adaptação das estirpes inoculantes à condição de acidez dos solos tropicais.

5 CONCLUSÕES

- As estirpes de *Bradyrhizobium* (Br 4406, Br 29, SEMIA 587 E INPA 03-11b) tiveram um comportamento diferenciado em meio líquido com pH 5,0, 6,0 e 6,9, obtendo melhor desempenho em pH 6,0, tanto em número de UFC quanto em produção de exopolissacarídeos.
- O melhor crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* em meio de cultivo com pH 6,0 e sua sobrevivência em turfa com pH corrigido para 6,0, demonstram possibilidade do uso de inoculantes corrigidos para esse valor de pH.
- A maior quantidade de exopolissacarídeos parece conferir tolerância a pH 6,0.
- Os valores de pH 5,0, 6,0 e 6,9 utilizados no cultivo de rizóbio em inoculante turfoso não afetaram a eficiência simbiótica das estirpes em soja.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, S.R.; GRAHAM, P.H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*, The Hague, v.134, n.2, p.145-151, 1991.
- ALVA, A.K.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; SUTHIPRADIT, S. Effect of acid soil infertility factors on growth and nodulation of soybean. *Agronomy Journal*, Madison, v.79, n.2, p.302-306, Mar./Apr. 1987.
- AYANABA, A.; ASANUMA, S.; MUNNS, D.N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.47, n.2, p.256-258, Mar. 1983.
- BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S. Efeito de diferentes tratamentos de inoculação com rizóbio no crescimento e nodulação de *Enterolobium contortisilyquum* (Vell) Morong. In: SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/CNPq, 2., 1994, Lavras, MG; CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESAL/UFLA - CICESAL, 8., 1994, Lavras, MG. Resumos... Lavras, MG: UFLA, 1994. p.91.
- BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology*, Washington, v.49, n.2, p.359-378, June, 1985.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.27, n.4/5, p.683-697, 1995.
- BROEK, A.V.; VANDERLYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.8, n.6, p.800-810, 1995.
- BROMFIELD, E.S.P.; JONES, D.G. Studies on acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture and soil. *Journal Applied Bacteriology*, Washington, v.48, n.3, p.243-264, Mar. 1980.
- CAMARGO, O. A.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas: IAC, 1986. 94 p.

- CHEN, H, RICHARDSON, A.E.; ROLFE, B.G. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.59, n.6, p.1798-1804, June, 1993.
- CLARKE, L.M.; DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. Survival of *Rhizobium meliloti* culture: effect of combined pH shock and carbon substrate stress. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.9, p.1289-1291, Feb. 1993.
- CLINE, G.R.; KAUL, K. Inhibitory effects of acidified soil on the soybean/Bradyrhizobium symbiosis. *Plant and Soil*, The Hague, v.129, n.2, p.243-249, Dec. 1990.
- CORREA, O.S.; BARNEX, A.J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v.13, n.2, p.153-157, 1997.
- CRAWFORD, S.L.; BERRYHILL, D.L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based legume inoculants applied to seeds. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.45, n.2, p.703-705, Feb. 1983.
- CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.N. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.48, n.6, p.1273-1276, Nov./Dec. 1984a.
- CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminum activity. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.48, n.6, p.1276-1280, Nov./Dec. 1984b.
- DATE, R.A.; HALLIDAY, J. Selecting *Rhizobium* for acid interfile soils of the tropics. *Nature*, London, v.277, n.4, p.62-64, Jan. 1979.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry Biophysics*, Acta, v.127, n.3, p.285-294, 1966.
- DILWORTH, M.J.; RYNNE, F.G.; CASTELLI, VIVAS-MARFISI, A.I.; GLENN, A.R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, Washington, v.145, n.8, p.1585-1593, Mar. 1999.

- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas: A importância das bactérias endofíticas. CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 12., 1996, Águas de Lindóia Resumos... Piracicaba: ESALQ, 1996.
- DOBEREINER, J.; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. *Revista de Economia rural*, Brasília, v.18, n.3, p.447-460, jul./set. 1980.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. *Manual de métodos e análises de solos*. Rio de Janeiro, 1979. 79 p.
- ESWRAN, H.; REICH, P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.; SCHAFFER, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (ed.) *Plant-Soils Interactions at Low: Sustainable Agriculture and Forestry Production*. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 159-164
- FABER, J.M.; PAGOTTO, F. The effects of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, Ottawa, v.15, n.4, p.197-201, 1992.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; STAMFORD, N.P.; BURITY, H.A. Efeito da temperatura de armazenamento na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.15, n.1, p.173-178, abr/set.1991.
- FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.173, n.5, p.5129-5135, Dec. 1991.
- FOUILLEUX, G.; REVELLIN, C.; CATROUX, G. Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during the inoculation process using mineral microgranules. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.40, n.4, p.322-325, Apr. 1994.
- FRANCO, A.A.; FONSECA, O.O.M.; MARRIEL, L. Efeito do nitrogênio mineral na atividade da nitrogenase e nitrato redutase durante o ciclo da soja no campo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.2, n.1, p.110-114, maio/ago. 1978.

- GLENN, A.R.; TIWARI, R.P.; REEVE, W. G.; DILWORTH, M.J. The response of root bacteria to acid stress. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.; SCHAFFER, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (ed.) **Plant-Soils Interactions at Low: Sustainable Agriculture and Forestry Production**. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 123-138
- GOMEZ, M.; SILVA, M.; HARTMANN, A.; SAGARFOY, M.; CATROX, G. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.12, n.1, p.167-173, 1997.
- GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Habituation to normally lethal acidity by prior growth *Escherichia coli* at a sub lethal acid pH value. **Letters in Applied Microbiology**, Ottawa, v.8, n.1, p.77-79, 1989a.
- GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Resistance of acid-habituation *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. **Letters in Applied Microbiology**, Ottawa, v.8, n.2, p.211-214, 1989b.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.3, p.475-484, 1991.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Reserch**, v.5, n.1, p.121-128, 1982.
- HANKINSON, T.R.; SCHMIDT, E.L. Examination of an acid forest soil fo ammonia and nitrite-oxidisintg autotrophic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.30, n.8, p.1125-1132, 1984.
- HARTEL, P.G.; ALEXANDER, M. Growth and survival fo cowpea rhizobia in acid, aluminum-rics soils. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v.47, n.3, p.502-506, May/June 1983.
- HOWIESON, J.G.; EWING, M.A. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* Symbiosis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Murdoch, v.37, n.1, p.55-64, 1986
- HOWIESON, J.G.; EWING, M.A.; D'ANTUONO, M.F. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. **Plant and Soil**, The Hague, v.105, n.2, p.179-188, 1988.

- HOWIESON, J.H.; EWING, M.A.; THORN, C.W.; REVEL, C.K. Increased yield in annual species of *Medicago* grown in acidic soil in response to inoculation with acid-tolerant *Rhizobium meliloti*. In: Wright, R.J.; Baligar, V.C.; Murrmann, R.P. (ed) **Plant-Soil Interactions at Low pH**. Kluwer, Dordrecht, 1991. p.589-595
- HOWIESON, J.G.; ROBSON, A. D.; ABBOTT, L.K. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. **Australian Journal Plant Physiology**, Murdoch, v.19, n.3, p.287-296, 1992.
- HSUCHEN, C.C.; FEINGOLD, D.S. The mechanism of polymyxin B action and selectivity towards biologic membranes. **Biochemistry**, Washington, v.12, n.11, p.2105-2111, 1973.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Effects of calcium, manganese, and aluminium on growth of rhizobia in acid media. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v.43, n.3, p.500-503, May/June 1979a.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v.43, n.3, p.519-523, May/June 1979b.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N.; HOHENBERG, J.S. Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v.43, n.3, p.719-722, May/June 1979.
- LANGWORTH, T.A. Microbial life in extreme pH value. In: Kushner, D.J. (ed). **Microbial life in extreme environments**. New York: Academic Press, 1978. p.279-315.
- LESUEUR, D.; DIEM, H.G.; DIANDA, M.; LE ROUX, C. Selection of Bradyrhizobium strains and provenances of *Acacia mangium* and *Faidherbia albida*: relationship with their tolerance to acidity and aluminum. **Plant and Soil**, The Hague, v.149, n.2, p.159-166, Feb. 1993.
- LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.59, n.6, p.1842-1847, 1993.

- LOWENDORF, H.S.; ALEXANDER, M. Identification of *Rhizobium phaseoli* strains that are tolerant or sensitive to soil acidity. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.45, n.3, p.737-742, Mar. 1983a.
- LOWENDORF, H.S.; ALEXANDER, M. Selecting *Rhizobium meliloti* for inoculation of alfafa planted in acid soils. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.47, n.5, p.935-938, Sept./Oct. 1983b.
- MAAGD, R.A.; WIENTJES, F.B.; LUGTENBERG, B.J.J. Evidence for divalent cation (Ca^{2+})-stabilised oligomeric proteins and covalently bound protein-peptidoglycan complexes in the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.171, n.10, p.3989-3995, 1989.
- MAGALHÃES, F.M.M. Present state of knowledge on biological nitrogen fixation in Amazonia. In: SYMPOSIUM ON THE HUMID TROPICS, 1., 1986, Belém, PA. *Proceedings...*, Belém: EMBRAPA, CPATU, 1986. v.1, p.499-512.
- MARRIEL, I.E. Efeitos de fatores limitantes sobre o crescimento de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan e soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Viçosa: UFV, 1984. 114p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- MATSUDA, A. Tolerância "in vitro" e sobrevivência no solo de espécies de rizóbio de leguminosas tropicais a metais pesados. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- MIGUEL, D.L.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Em meios de cultura com diferentes valores de pH. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., 1998, Caxambu; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7., 1998, Caxambu; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5, 1998, Caxambu; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. *Resumos...* Lavras: UFLA, 1998. p. 225. (FertBio 98)

- MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimations of the bacteriocidal power of the blood. *Journal Hyg., Cambridge*, v.38, n.6, p.732-749, 1938.
- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, London, v.7, n.3. p.889-995, Apr. 1998.
- MOROTE, C.G.B.; VIDOR, C.; MENDES, N.G.; PEREIRA, J.S. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v.14, n.2, p.143-150, abr/ago. 1990.
- MUNNS, D.N. Soil acidity related factors. In: VINCENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J. (eds.). *Exploiting the legume – Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Bawai: Univ. Bawai, 1977. p.211-236. (Collection Tropical Agriculture).
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Response of Rhizobium strains to acid and aluminium stress. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.13, n.2, p.115-118, mar. 1981.
- NEVES, M.C.P.; RAMOS, M.L.G.; MARTINAZZO, A.R.; BOTELHO, G.R.; DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. In: MULONGO, K.; GUEYE, M.; SPENCER, D.S.C. (ed.). *Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture*. Chichester: Wiley-Sayce, 1992. p. 219-233.
- O'HARA, G.W.; GLENN, A.R. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, Murdoch, v.161, n.4, p.286-292, 1994.
- O'HARA, G.W.; GOSS, T.J. DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.55, n.8, p.1870-1876, 1989.
- OLIVEIRA, J.C.; RAMOS, M.L.G.; DUQUE, F.F. Inoculação da soja, em solo de cerrado no primeiro ano de cultivo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.15, n.3, p.273-276, set./dez. 1991.

- OLIVEIRA, L.A.; VIDOR, C. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.8, n.2, p.49-55, jan./abr. 1984a.
- OLIVEIRA, L.A.; VIDOR, C. Colonização, sobrevivência e competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.8, n.2, p.57-62, maio/ago. 1984b.
- PARKINSON, D.; COLEMAN, D.C. Microbial communitus, activity and biomass. In: CROSSLEY, D.A. (ed.). *Agriculture, Ecosystems and Environments*. Amsterdam: Elsevier, v.34, p.03-33, 1991.
- PERES, J.R.R.; MENDES, L.C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, v.17, n.3, p.357-363, set./dez. 1993.
- PERES, J.R.R.; VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v.4, n.2, p.139-143, maio/ago. 1980.
- REEVE, W.G.; DILWORTH, M.J.; TIWARI, R.P.; GLENN, A. R. Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae WSM710 involves exoR. *Microbiology*, Washington, v.143, n.10, p.1951-1958, May. 1997.
- REEVE, W.G.; TIWARI, R.P.; DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.25, n.5, p.581-586, Nov. 1993.
- REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DA TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA - RELARE, 8., 1998, Londrina. Ata... Londrina: EMBRAPA Soja, 1998. 4p.
- REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM - RELARE, 7., 1996, Campinas. Ata... Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 2p.

- RIBEIRO Jr., W.Q.; FRANCO, A.A.; LOPES, E.S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Brazyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v.10, n.2, p.219-225, maio/ago. 1986.
- RIBEIRO Jr., W.Q.; LOPES, E.S.; FRANCO, A.A. Eficiência de estirpes de *Brazyrhizobium* spp., para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v.11, n.2, p.275-282, maio/ago. 1987.
- RICHARDSON, A.E.; DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE, B.G.; SIMPSON, R.J. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, The Hague, v.19, n.1, p.37-47, 1988.
- RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Acid-tolerance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium trifolii* associated with a *Trifolium subterraneum* L. based pasture growing in an acid soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.21, n.1, p.87-95, 1989.
- RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J.; DJORDJEIC, M.A.; ROLFE, B.G. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.54, n.11, p.2541-2548, 1988.
- ROBSON, A. D.; LONERAGAN, J.F. Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils: I. Effects of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of *Medicago truncatula* on a moderately acid soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, Murdoch, v.21, n.3, p.427-437, 1970a.
- ROBSON, A. D.; LONERAGAN, J.F. Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. II. Colonization of acid soils by *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agricultural Research*, Murdoch, v.21, n.3, p.435-445, 1970b.
- SILVA, G.G.; FRANCO, A.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais em meio de cultura tolerantes à acidez e à toxicidade do Al. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.19, p.169-173, jun. 1984.

- SMITH, R.S. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, n.3, p.485-491, 1992.
- SOMASEGARAN, P.; REYES, V.G.; HOBEN, H.J. The influence of high temperatures on the growth and survival of *Rhizobium* spp, in peat inoculants during preparation, storage, and distribution. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.29, n.1, p.23-30, 1984.
- SOUZA, L.A.G.; MAGALHÃES, M.M.M.; OLIVEIRA, L.A. Avaliação do crescimento de *Rhizobium* de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, p.165-168, jun. 1984.
- SPARROW, S.D.; HAM, G.E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. *Agronomy Journal*, Madison, v.75, n.2, p.181-184, Mar./Apr. 1983.
- TANG, C.; THOMSON, B.D. Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legume species. *Plant and Soil*, The Hague, v.186, n.3, p.321-330, 1996.
- THORNTON, F. C.; DAVEY, C.B. Acid tolerance of *Rhizobium* in culture media. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.47, n.3, p.496-501, May/June 1983.
- TRANNIN, I. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a metais pesados "in vitro" e em simbiose. Lavras: UFLA, 1999. 125p. (Dissertação – Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- VARGAS, A.A.T.; DENARDIN, N.D. Tolerância à acidez e ao alumínio do solo, de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* isoladas no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v.16, n.3, p.337-342, set./dez. 1984.
- VARGAS, M.A.T. MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Duas novas estirpes de rizóbio para inoculação da soja. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. (Boletim Técnico, 62)
- VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, n.8, p.1127-1132, ago. 1982.

- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Efeitos da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja em um solo de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.4, n.1, p.17-21, jan./abr. 1980.
- VETTORI, L. *Métodos de análise de solo*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico, 7).
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M.H.T. Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. IPAGRO, 1983. p.51 (Boletim Técnico,1)
- VINCENT, J.M. Influence of calcio and magnesium on the growth of *Rhizobium*. *Journal General Microbiology*, London, v.28, n.4, p.653-663, 1962.
- VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. London: JBP, 1970. 164p. (Handlbook, 15).
- WATKIN, E.L.J.; O'HARA, G.W.; GLENN, A.R. Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.9/10, p.1427-1432, Sept./Oct. 1997.
- WOOD, M.; SHEPHERD, G. Characterization of *Rhizobium trifolii* isolated from soils of diferent pH. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, n.3, p.317-321, 1987.
- WRIGHT, R. J.; BALIGAR, V. C.; MURRMANN, R.P. *Plant-soil interactions at low pH*. 1991.Kluwer, Dordecht.

ANEXOS

LISTA DE TABELA

Tabela 1A. Número médio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC, \log_{10} mL ⁻¹) de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp e regressões em função do pH do meio de cultura.....	42
---	----

TABELA 1A. Número médio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC, \log_{10} mL⁻¹) de estirpes de *Bradyrhizobium* spp e regressões em função do pH do meio de cultura

Estirpe	pH	Tempo (horas)								Equação de regressão	r ²
		48	72	96	120	144	168	192	216		
----- Log UFC mL ⁻¹ -----											
Br 4406	5,0	6,96 c	7,95 b	8,69 b	8,80 a	8,97 a	9,00 b	9,03 a	9,05 b	$y = -0.00563 - 0.05241x + 1.3810x^{0.5}$	0.999**
	6,0	7,52 a	8,34 a	8,95 a	8,92 a	8,53 b	9,21 a	8,99 a	9,21 a	$y = 0.05895 - 0.05845x + 1.4591x^{0.5}$	0.991**
	6,9	7,16 b	8,05 b	8,78 b	8,93 a	8,99 a	8,56 c	9,02 a	9,03 b	$y = -0.01190 - 0.05622x + 1.4249x^{0.5}$	0.995**
Br 29	5,0	6,96 b	7,77 b	8,49 b	8,65 b	8,86 a	8,80 b	8,88 a	8,70 b	$y = -0.00649 - 0.05322x + 1.3754x^{0.5}$	0.999**
	6,0	7,62 a	8,40 a	8,92 a	8,64 b	8,71 b	9,02 a	8,84 a	8,94 a	$y = 0.06360 - 0.06161x + 1.4895x^{0.5}$	0.994**
	6,9	7,00 b	7,72 b	8,52 b	8,79 a	8,79 ab	8,75 b	8,90 a	8,84 a	$y = 0.00319 - 0.05279x + 1.3718x^{0.5}$	0.999**
SEMIA 587	5,0	6,90 c	7,94 b	8,31 b	8,73 b	8,78 ab	8,83 b	8,88 b	8,85 b	$y = 0.00533 - 0.0528x + 1.3621x^{0.5}$	0.999**
	6,0	7,51 a	8,34 a	8,49 a	9,00 a	8,70 b	9,06 a	9,05 a	9,14 a	$y = 0.06332 - 0.05692x + 1.4365x^{0.5}$	0.995**
	6,9	7,16 b	7,97 b	8,54 a	8,78 b	8,86 a	8,61 c	8,81 b	9,03 a	$y = 0.03057 - 0.05464x + 1.3958x^{0.5}$	0.997**
INPA 03-11b	5,0	6,37 c	7,07 c	8,12 b	8,54 b	8,79 a	8,75 a	8,98 a	8,91 a	$y = -0.03039 - 0.0479x + 1.2139x^{0.5}$	0.998**
	6,0	7,39 a	8,31 a	8,51 a	8,88 a	8,78 a	8,62 ab	8,95 a	9,06 a	$y = 0.05782 - 0.05756x + 1.4360x^{0.5}$	0.994**
	6,9	7,06 b	7,90 b	8,54 a	8,77 ab	8,82 a	8,44 b	8,69 b	8,97 a	$y = 0.02158 - 0.05478x + 1.3919x^{0.5}$	0.995**

(1) Médias de UFC seguidas pela mesma letra na vertical dentro de cada tempo, não diferem entre si, pelo teste de Duncan. **1% de significância, respectivamente.