ASPECTOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS EM ESPÉCIES DE *Rhizobium*

MARIA JOSÉ VALARINI

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1981

Aos

meus pais,

meus irmãos,

minhas avós Alzira e Maria Rosa,

Fábio e Matheus

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação.
- À Dra. Siu Mui Tsai Saito, pela iniciação na Rizobiologia, inestimável colaboração, sugestões, incentivo e amizade constantes.
- Ao Prof. Dr. Manoel Victor Lemos, pela análise eletroforética.
- À Profa. Dra. Alaides Puppim Ruschel, pelas facilidades concedidas na Seção de Microbiologia do Solo - CENA/USP, Piracicaba.
- Ao Afonso, pela compreensão e estímulo.
- Aos colegas de curso Teresa Lousada Valle, Flávia Maria de Oliveira, Ana Maria de Andrade, Cristina H. Rupp de Paiva, Sérgio Tulio Cassini, pelo companheirismo e amizade.
- Aos Funcionários e demais Colegas do Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética - ESALQ.
- Aos Funcionários e Amigos da Seção de Microbiologia do Solo do CENA/USP, Piracicaba.
- Ao Instituto de Zootecnia - Nova Odessa, nas pessoas do então Diretor Geral Dr. José Vicente Silveira Pedreira e do atual, Dr. Edgar Leone Caielli.
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Departamento de Genética.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Resistência a Drogas e pH	4
2.1.1. Resistência a Antimicrobianos e suas Implicações com a Simbiose	4
2.1.2. Metais e pH	14
2.1.3. Genética da Associação Simbiótica	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Espécies e Estirpes de <i>Rhizobium</i> Utilizadas	26
3.1.1. <i>Rhizobium</i> spp	26
3.1.2. <i>Rhizobium phaseoli</i>	26
3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas	29
3.2.1. Y M A (Yeast Manitol Agar) (FRED <i>et alii</i> , 1932)	29
3.2.2. Meio modificado para pH (GRAHAM <i>et alii</i> , 1981)	29
3.2.3. Água de Levedura (VINCENT, 1970)	30
3.2.4. Solução de Azul de Bromotimol	30
3.2.5. Solução de Vermelho Congo	30
3.2.6. Solução Salina	31
3.2.7. Solução Tampão para Eletroforese (TEB)	31
3.2.8. Solução Nutritiva para Planta (McKNIGHT, 1949)	31
3.2.9. Sublimado Corrosivo	32
3.3. Drogas Utilizadas	33
3.3.1. Antimicrobianos Utilizados	33
3.3.2. Sais de Metais Utilizados	33
3.4. Soluções Estoques das Drogas	36
3.5. Determinação dos Níveis Naturais de Resistência às Drogas, Tolerância a Baixo pH e Isolamento de Mutantes Resistentes .	36

	<u>Página</u>
3.6. Isolamento de Bactérias de Nódulos	38
3.7. Curvas de Crescimento de Estirpes de <i>Rhizobium</i> Selvagem e Resistente a Antibióticos	39
3.8. Ensaio de Nodulação em Casa-de-Vegetação	40
3.9. Avaliação da Infectividade	40
3.10. Atividade da Nitrogenase	41
3.11. Separação de DNA Extracromossômico em Gel de Agarose (LEMOs, 1980)	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Determinação do Al Trocável	43
4.2. Níveis Naturais de Resistência a Drogas e a pH	45
4.3. Isolamento de Mutantes Resistentes a Antibióticos e Cur- vas de Crescimento	45
4.4. Avaliação da Infectividade e Efetividade de Estirpes Selva- gens e Mutantes de <i>Rhizobium spp</i>	56
4.5. Eletroforese em Gel de Agarose para Separação de DNA Ex- tracromossômico	57
5. DISCUSSÃO	61
5.1. Determinação do Alumínio Trocável	61
5.2. Níveis Naturais de Resistência a Antimicrobianos	62
5.3. Resistência a Metais e pH	66
5.4. Isolamento de Mutantes Resistentes a Antibióticos e Curvas de Crescimento	69

5.5. Avaliação da Infectividade e Efetividade de Estirpes Selva gem e Mutante de <i>Rhizobium</i> spp	70
5.6. Perfis de DNA Extracromossômico das Estirpes de <i>Rhizobium</i> Utilizadas	71
6. CONCLUSÕES	74
7. LITERATURA CITADA	75

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Níveis de resistência natural a antibióticos e quimioterápicos encontrados na literatura para <i>Rhizobium phaseoli</i> .	6
2 - Níveis de resistência natural a antibióticos e quimioterápicos encontrados na literatura para <i>Rhizobium spp</i> (grupo "cowpea")	7
3 - Limites de concentrações totais e trocáveis de metais encontrados nos solos	15
4 - Concentrações de Cd encontradas em fertilizantes (OMAE, 1979)	16
5 - Níveis naturais de resistência a metais pesados, encontrados em literatura, para diferentes espécies de bactérias	18
6 - Valores médios de pH para diferentes solos brasileiros (SANCHES, 1976)	20
7 - Níveis mínimos de tolerância a pH, encontrados em literatura, para <i>Rhizobium sp</i>	22
8 - Estirpes de <i>Rhizobium spp</i> utilizadas	27
9 - Estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i> utilizadas	28
10 - Constituições químicas, modos de ação e fabricantes dos	

TabelaPágina

antimicrobianos utilizados	34
11 - Pesos moleculares, porcentagens do elemento e solubilida <u>de</u> de dos sais de metais utilizados	35
12 - Quantidades e diluições utilizadas para obtençã <u>o</u> de dife <u>re</u> rentes concentrações de drogas no meio de cultura	37
13 - Determinação do Al trocá <u>ve</u> l em meio de cultura sólido, segundo diferentes concentrações de $Al_2(SO_4)_3$ adicionadas	43
14 - Níveis naturais de resistência a antimicrobianos (μ g/ml) de estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	46
15 - Níveis naturais de resistência a antimicrobianos (μ g/ml) para estirpes de <i>Rhizobium spp</i>	47
16 - Níveis naturais de resistência a metais (μ g/ml), encontra <u>do</u> dos para estirpes de <i>R. phaseoli</i> em meio sólido	48
17 - Níveis de resistência a metais (μ g/ml), encontrados em es <u>t</u> tirpes de <i>R. spp</i> , em meio sólido	49
18 - Limites dos níveis de resistência dos metais utilizados pa <u>ra</u> as estirpes de <i>R. phaseoli</i> e <i>R. spp</i>	50
19 - Níveis naturais de tolerância a pH, em meio sólido, para as estirpes de <i>R. phaseoli</i> e <i>R. spp</i> utilizadas	53
20 - Contagem do número de células viáveis em função do tempo	

Tabela

Página

e valores de absorbância espectrofotométrica para as es-	
tirpes C-62 e C-62 spc ⁺ str ⁺ de <i>Rhizobium</i> spp	54
21 - Valores avaliativos da infectividade e efetividade de es-	
tirpes de <i>Rhizobium</i> spp C-62 selvagem, mutantes simples e	
duplos, resistentes a antibióticos inoculadas em <i>Vigna un-</i>	
<i>guiculata</i> , cultivada em solo por 42 dias (médias de 5	
repetições)	56

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Curva de liberação de Al trocável em meio de cultura sólido em função de concentrações crescentes de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$	44
2 - Distribuição gráfica dos níveis de resistência natural a diversas drogas em estirpes de <i>Rhizobium</i> spp (grupo "cowpea") e <i>Rhizobium phaseoli</i> utilizadas	51
3 - Distribuição gráfica dos níveis de resistência natural a diversas drogas em estirpes de <i>Rhizobium</i> spp (grupo "cowpea") e <i>Rhizobium phaseoli</i> utilizadas	52
4 - Curvas de crescimento de estirpes selvagem e mutante resistente a antibióticos para estirpe C-62 de <i>Rhizobium</i> spp	55
5 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para <i>Rhizobium phaseoli</i> e <i>Rhizobium</i> spp (grupo "cowpea"), mostrando a presença de bandas de DNA plasmidial de pesos moleculares estimados entre 10^6 e 10^8 Daltons	58
6 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para 9 lisados de <i>Rhizobium phaseoli</i> C-88, carregando uma banda de DNA plasmidial (P.M. $\approx 10^8$ Daltons)	59
7 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para <i>Rhizobium phaseoli</i> e <i>Rhizobium</i> spp (grupo "cowpea")	60

ASPECTOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS EM ESPÉCIES DE *Rhizobium*

Maria José Valarini

João Lúcio de Azevedo
Orientador

RESUMO

Estirpes de *Rhizobium* de crescimento lento (*Rhizobium* spp, grupo "cowpea") e de crescimento rápido (*Rhizobium phaseoli*) foram ensaiadas quanto aos níveis de resistência natural, a antibióticos e metais pesados, tolerância a pH baixo, eficiência simbiótica de estirpes mutantes resistentes a antibióticos e caracterizadas, em eletroforese sobre gel de agarose, quanto ao DNA extracromossômico.

Os níveis naturais de resistência aos 12 antibióticos, bem como aos 11 metais ensaiados foram, em geral, mais elevados para as estirpes de crescimento lento, sendo que as mesmas toleraram pH mais baixo que as de crescimento rápido (específicas). Dentre as drogas, níveis mais altos de resistência foram obtidos para aquelas interferentes da síntese e permeabilidade da membrana e parede celulares.

A eficiência simbiótica das estirpes mutantes resistentes à estreptomicina e/ou espectinomomicina foi inferior às estirpes selvagens correspondentes, devido, principalmente, à baixa porcentagem de infecção.

A presença de DNA extracromossômico (plasmídios) foi observada para três estirpes de *Rhizobium* spp e para quatro de *R. phaseoli*, sendo que algumas delas apresentaram mais de uma banda extracromossômica. Nenhuma característica fenotípica foi associada à presença dos plasmídios; capacidade simbiótica nem sempre correlacionou-se com presença de tais elementos extracromossômicos.

GENETIC AND ECOLOGICAL ASPECTS IN *Rhizobium* SPECIES

Maria José Valarini

João Lúcio de Azevedo

Adviser

SUMMARY

Slow (*Rhizobium* spp) and fast (*R. phaseoli*) growing strains of *Rhizobium* were tested for natural resistance to antibiotic and heavy metals, low pH tolerance, test for efficiency of the mutants and agarose gel electrophoresis characterization for the extrachromosomal DNA.

The natural resistance to 12 antibiotics as well as to 11 metals were, in general, higher to the slow-growing strains ("cowpea" group), showing also higher tolerance to low pH than the specific strains. Among the antibiotics, the levels of resistance were higher for thought to affect cell wall-cell membrane synthesis and permeability. The symbiotic efficiency of the mutants streptomycin and/or spectinomycin resistant were lower than the wild type this attributing mainly to a loss of infectivity.

The occurrence of extrachromosomal DNA (plasmids) was observed in three strains of *Rhizobium* spp and four strains of *R. phaseoli*, some of them presenting more than one extrachromosomal plasmidial band. No one phenotypic characteristic could be related to the presence of plasmids therefore symbiotic ability was not necessarily correlated with the presence of such extrachromosomal particles.

CURRICULUM VITAE

MARIA JOSÉ VALARINI, natural de Tietê, Estado de São Paulo, filha de Horácio Valarini e Antônia Pizzol Valarini, obteve o Título de Engenheira Agrônoma pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Foi admitida, através de Concurso Público, no Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, onde, atualmente, exerce o cargo de Engenheira Agrônoma junto à Seção de Agronomia de Plantas Forrageiras. Ingressou no Curso de Pós-Graduação da ESALQ/USP em Genética e Melhoramento de Plantas, junto ao Departamento de Genética - Setor de Genética de Microorganismos e, atualmente, desenvolve pesquisas na área de Fixação Biológica de Nitrogênio.

1. INTRODUÇÃO

A relação simbiótica entre leguminosas e bactérias fixadoras de N_2 atmosférico (*Rhizobium*) é um processo biológico cuja importância está basicamente na redução de N_2 a NH_3 , utilizando-se de material energético produzido direta ou indiretamente pela fotossíntese vegetal. Tal associação envolve compatibilidade entre diversos fatores de ambas as partes referidas em interação com o solo, os quais determinam o nível de efetividade da fixação e, conseqüentemente, o sucesso no fornecimento do nitrogênio para o bom desenvolvimento da planta. A importância desse sistema simbiótico vem sendo cada vez mais reconhecida, principalmente dentro dos agravantes econômicos atuais: 12 milhões de toneladas de soja-grão são produzidos anualmente no Brasil sem utilização de fertilizantes nitrogenados minerais, os quais sem fixação biológica, representariam 5 milhões de toneladas; para produção industrial de uma tonelada de nitrogênio são necessários 7 barris de petróleo (DÖBEREINER *et alii*, 1978).

Embora de extrema importância, especialmente para países como o Brasil, cuja economia é dependente da Agricultura e da importação de fertilizantes, a variabilidade existente no Gênero *Rhizobium* ainda não tem

sido estudada de modo conveniente, principalmente em espécies e estirpes isoladas de regiões tropicais e solos ácidos. De fato, para tal Gênero de bactérias, tem sido proposta uma subdivisão em dois grupos para distinção entre estirpes de crescimento rápido e de crescimento lento, sugerindo existirem diferenças enzimáticas entre estes grupos, principalmente àquelas relacionadas com o metabolismo de carboidratos. Considerável grau de especificidade e "promiscuidade" tem sido também verificadas entre os referidos grupos. Por outro lado, a associação de estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido com solos alcalinos tem sido feita por vários autores; contudo, variação na tolerância a pH, alumínio e manganês verificam-se para espécies produtoras de ácidos, bem como para espécies produtoras de álcalis, não havendo evidências em ecologia microbiana as quais se refiram a organismos produzindo substâncias menos ácidas ou mais básicas para possibilitar-lhes adaptação a ambientes ácidos. Tais fatos sugerem a existência de uma alta variabilidade neste Gênero de bactérias e, conseqüentemente, uma dificuldade e falta de critérios para uma classificação mais apropriada.

Especialmente em solos tropicais, onde leguminosas são cultivadas regularmente, existem várias estirpes de *Rhizobium* capazes de nodular uma determinada planta. Marcadores para identificação de estirpes devem, contudo, não alterar a performance das mesmas. As bases genéticas das mudanças na eficiência simbiótica não são nitidamente conhecidas, mas sabe-se que um largo espectro de mutações alteram-na.

O presente trabalho objetivou comparar o comportamento de dois grupos de *Rhizobium*, caracterizados por crescimento rápido (*Rhizobium phaseoli*) e crescimento lento (*Rhizobium* spp, grupo "cowpea") quanto à tole

rância a baixo pH, teores elevados de metais pesados e antibióticos, numa tentativa de determinar suas potencialidades genéticas e ecológicas de sobrevivência a condições adversas. Em algumas estirpes foram também determinados, de forma preliminar, os perfis de DNA extracromossômico, visando detectar-se a existência de plasmídios, os quais muitas vezes, são responsáveis por resistência a tais condições adversas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência a Drogas e pH

2.1.1. Resistência a Antimicrobianos e Suas Implicações com a Simbiose

A distinção entre estirpes de uma mesma espécie de *Rhizobium* depende, principalmente, de testes morfológicos, compreendendo entre outros aspectos, morfologia de colônias, forma e cor de nódulos (CLOONAN, 1963; DOBEREINER, 1965; PINTO *et alii*, 1974); testes sorológicos (JOSEY *et alii*, 1979) ou genético-fisiológicos, envolvendo determinação de requisitos para vitaminas e outras deficiências nutricionais, resistência a fagos e antibióticos (GEORGI e ETTINGER, 1941; DAVIS, 1962; GRAHAM, 1963a; YADOV e YVAS, 1972).

Dentro desse contexto, a resistência aos antibióticos e quimioterápicos pode ser utilizada em duas áreas de pesquisa relativas à fisiologia da nodulação em leguminosas. Se a resistência não está associada à perda da eficiência simbiótica, poder-se-ia utilizá-la como marcador genético na identificação de estirpes em estudos ecológicos, uma vez que estirpes nativas podem ser responsáveis por 90% da nodulação, a despeito da inocu-

lação com outras estirpes desejáveis de *Rhizobium* (JOHNSON *et alii*, 1965; CALDWELL e VEST, 1970). Se a resistência está relacionada com perda da efetividade simbiótica, poderá ser utilizada para elucidar mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorrentes no *Rhizobium* durante sua transformação em bacteróides fixadores de N_2 nos nódulos (PANKHURST, 1977; LEVIN e MONTGOMERY, 1974; SCHWINGHAMER, 1968).

Um dos principais inconvenientes no uso de mutantes resistentes a antibióticos está na falta de conhecimento do modo biológico de ação dos principais antibióticos e comumente mais que um sítio de inibição está envolvido para um mesmo antibiótico, podendo confundirem-se efeitos secundários com efeitos primários nas células (SCHWINGHAMER, 1968). Diversos trabalhos que tratam de níveis de resistência a antibióticos, infectividade e efetividade de estirpes de *Rhizobium* modificadas por esta resistência referem-se, principalmente, a espécies de crescimento rápido (*R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* e *R. trifolii*), sendo os resultados, algumas vezes, contraditórios. A Tabela 1 mostra a variabilidade existente nos níveis de resistência natural para antibióticos e quimioterápicos encontrados para estirpes de *R. phaseoli* por diferentes autores. Espécies de crescimento lento do grupo "cowpea" são menos frequentemente estudadas nesse aspecto e referidas como menos susceptíveis aos antibióticos (GRAHAM, 1963b). Os diversos níveis de resistência a diferentes antibióticos e quimioterápicos encontrados para *Rhizobium* spp (grupo "cowpea") estão relacionados na Tabela 2.

Resistência a antibióticos como marcador genético em *Rhizobium* tem sido utilizada na medida em que não afetem propriedades simbióticas das estirpes. Os efeitos sobre a eficiência simbiótica associados a resistência a antibióticos da bactéria têm sido algumas vezes controverti-

TABELA 1 - Níveis de resistência natural a antibióticos e quimioterápicos encontrados na literatura para *Rhizobium phaseoli*.

Antibióticos e Quimioterápicos	Nível de Resistência (µg/ml)	Referência
<u>Grupo I</u>		
Estreptomicina	1 - 10	CASSINI (1980)
	2 - 10	SCHWINGHAMER, 1967; JOSEY <i>et alii</i> (1979)
	0,1 - 50	GRAHAM (1963b)
Espectinomicina	1 - 20	CASSINI (1980)
	2 - 10	SCHWINGHAMER e DUDMAN (1973)
Cloranfenicol	1 - 50	CASSINI (1980)
	20 - 40	PANKHURST (1977)
	250	SCHWINGHAMER (1967)
	4	GRAHAM (1963b)
Tetraciclina	0,01 - 0,2	CASSINI (1980)
	1	DAVIS (1962); PATTISON <i>et alii</i> (1974)
Eritromicina	2 - 5	JOSEY <i>et alii</i> (1979)
	50	GRAHAM (1963b)
<u>Grupo II</u>		
Ácido nalidixico	40 - 100	PANKHURST (1977)
	5 - 10	JOSEY <i>et alii</i> (1979)
<u>Grupo III</u>		
Vancomicina	0,5 - 2,0	PANKHURST (1977); SCHWIN GHAMER (1967)
	5	JOSEY <i>et alii</i> (1979)
Carbenicilina	10	JOSEY <i>et alii</i> (1979)
<u>Grupo IV</u>		
Neomicina	1 - 3	JOSEY <i>et alii</i> 1979
	15 - 30	SCHWINGHAMER (1967)
	50	GRAHAM (1963b)
Kanamicina	10 - 25	JOSEY <i>et alii</i> 1979; DAVIS (1962); PANKHURST (1977)
Polimixina	5 - 10	JOSEY <i>et alii</i> 1979

TABELA 2 - Níveis de resistência natural a antibióticos e quimioterápicos encontrados na literatura para *Rhizobium* spp (grupo "cowpea").

Antibióticos e Quimioterápicos	Nível de Resistência (µg/ml)	Referência
<u>Grupo I</u>		
Estreptomicina	0,1 - 50	GRAHAM (1963b)
	10	DAVIS (1962)
	75 - 150	PANKHURST (1977)
Espectinomicina	0,1 - 0,5	PANKHURST (1977)
Cloranfenicol	30	DAVIS (1962)
	100 - 300	PANKHURST (1977)
Tetraciclina	30	DAVIS (1962)
	75 - 125	PANKHURST (1977)
Eritromicina	15	DAVIS (1962)
<u>Grupo II</u>		
Ácido Nalidixico	10 - 50	PANKHURST (1977)
<u>Grupo III</u>		
Vancomicina	30	DAVIS (1962)
Ampicilina	-	-
Carbenicilina	-	-
<u>Grupo IV</u>		
Neomicina	500 - 750	PANKHURST (1977)
	50	GRAHAM (1963b)
Kanamicina	30	DAVIS (1962)
	25 - 150	PANKHURST (1977)
	300	DAVIS (1977)
Polimixina	150 - 300	PANKHURST (1977)

dos ou correlacionados em vários graus (SCHWINGHAMER, 1969; SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973; JOSEY *et alii*, 1979). Tais associações poderiam não apenas facilitar o isolamento de estirpes inefetivas como também de clones aparentados e com grandes diferenças na capacidade em estabelecer simbiose (GIBSON, 1962; SCHWINGHAMER, 1969). Há que se considerar que perda ocasional de efetividade pode ocorrer em estirpes de *Rhizobium* mantidas em cultura por grandes períodos de tempo. A probabilidade de ocorrência de tais perdas pode ser aumentada pela manutenção de crescimento em meio rico em substâncias nitrogenadas, particularmente glicina ou D-aminoácidos, os quais, aparentemente, podem aplicar forte pressão de seleção, favorecendo o crescimento de mutantes inefetivos (ALLEN e ALLEN, 1950 e SCHWINGHAMER, 1969). A inefetividade entre estirpes de mutantes de *Rhizobium* poderia ser atribuída à incapacidade de excreção de fatores de crescimento, produção anormal de polissacarídeos extracelulares e a relativa capacidade de destruição de níveis potencialmente tóxicos de peróxido de hidrogênio, formados nos nódulos (ALEXANDER e FRANCIS, 1974).

A interação entre efetividade e resistência a antibióticos é, obviamente, complexa, mas poderia se estabelecer que (a) fenotipicamente não há uma associação definitiva entre ganho de resistência e perda de efetividade simbiótica ou vice-versa. Supõe-se que tais mutações exerçam um efeito pleiotrópico e que a incapacidade para nodular (fenótipos não infectivos) ou para produzir nódulos inativos (fenótipos inefetivos) seja uma consequência da lesão inicial (MAIER e BRILL, 1976); (b) mutação para resistência tem aumentado a incidência de defeitos metabólicos (SCHWINGHAMER, 1969). A ocorrência de defeitos metabólicos, tais como super-produção ou excreção de metabólitos e alterações estruturais, resultantes de

mutação para resistência a essas drogas não podem, por outro lado, ser correlacionadas diretamente com perda da efetividade simbiótica (SCHWINGHAMER, 1969; LEVIN e MONTGOMERY, 1974; PANKHURST, 1977).

Assim, LEVIN e MONTGOMERY (1974), trabalhando com mutantes simples e duplos resistentes a vários antibióticos (kanamicina, estreptomicina e viomicina) em *Rhizobium japonicum*, não encontraram diferenças marcantes na infectividade ou efetividade de fixação do N_2 em soja. Sugeriram, os autores, que funções celulares as quais são inibidas por certos antibióticos não devem estar correlacionadas com propriedades simbióticas gerais. Por outro lado, vários autores afirmaram que perda da efetividade em mutantes resistentes à viomicina, bem como à estreptomicina, foi bastante frequente, podendo até mesmo ser utilizada como marcador seletivo para isolamento de estirpes inefetivas em algumas espécies (SCHWINGHAMER, 1964; JORDAN *et alii*, 1966; DUNICAN e CANNON, 1971; ALEXANDER e FRANCIS, 1974; ALVES, 1975; CASSINI, 1980). Perda da efetividade simbiótica também foi associada à resistência à neomicina em *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. meliloti*, sendo os mutantes perfeitamente recuperados nos nódulos (SCHWINGHAMER, 1964). O último autor verificou, ainda, que perda da efetividade foi infrequente em mutantes resistentes a kanamicina e polimixina, os quais mantiveram a capacidade de nodulação (infectividade). KECSKE'S e MANNINGER (1962), trabalhando com *Rhizobium* específico, verificou resistência à penicilina e sensibilidade à cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina e kanamicina. Por outro lado, PANKHURST (1977) concluiu que efetividade em quatro estirpes de *Rhizobium*, associado a *Lotus* não foi alterada em mutantes resistentes a estreptomicina, espectinomicina, cloranfenicol e tetraciclina, sendo reduzida em mutantes resistentes a ácido nalidixico, rifampicina, novobiocina e peni

cilina. Relata, ainda, o autor, que tal diversidade de informações sobre resistência a antibióticos em *Rhizobium* dificultaria sugerir-se qualquer generalização, inferindo que tal resistência pudesse ser de origem extracromossômica. Dentro desse aspecto ainda, GRAHAM (1963b) encontrou que aureomicina, terramicina e ledermicina foram mais efetivas em inibir crescimento; estreptomicina, neomicina e penicilina foram inibitórios em alguns casos e bacitrina, eritromicina e cloranfenicol não apresentaram efeito sobre o *Rhizobium*. Observou variações na susceptibilidade das estirpes: *Rhizobium* associado à tremoço e soja foram mais susceptíveis a vários antibióticos produzidos por *Streptomyces* que outros *Rhizobium* e menos susceptíveis que outros organismos do solo. Verificou, ainda, que espécies de *Rhizobium* de crescimento lento foram menos susceptíveis a antibióticos que as espécies de crescimento rápido estudadas. Nesse particular, GRAHAM (1963b) sugere que em certas áreas do oeste da Austrália, produção de antibióticos no solo pode ter sido importante fator no estabelecimento de leguminosas.

Resistência a estreptomicina tem sido um dos mais frequentes marcadores em estudos genéticos e ecológicos de linhagens de *Rhizobium*. PAIN (1979) isolou em *R. leguminosarum* mutantes resistentes à estreptomicina a uma frequência de 4.10^{-8} , sendo que os mesmos não apresentaram fenótipo simbiótico alterado. Semelhantes resultados foram obtidos por vários outros autores (KLECZKOWSKA, 1965; TRINICK, 1969; VINCENT, 1970; SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973). Por outro lado, ALVES (1975) e ALVES e AZEVEDO (1975) verificaram que mutantes resistentes a altas concentrações de estreptomicina em *R. japonicum* perderam a capacidade de nodular a planta hospedeira original, apresentando, também, redução da taxa de crescimento e uma meia vida relativa de 77 horas. CASSINI (1980), trabalhando com mutantes

resistentes à estreptomicina bem como a espectinomicina e rifampicina em *R. phaseoli*, encontrou diminuição significativa na capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio dos mutantes em relação às estirpes normais originais. Reforçou o autor a hipótese de que os mutantes resistentes devam apresentar o metabolismo, primária ou secundariamente alterado, uma vez que os genes conferindo resistência às drogas, não são adicionados e sim alterados de sua função original. LEVIN e MONTGOMERY (1974) observaram, também, que alterações da efetividade e infectividade em mutantes resistentes à estreptomicina variaram segundo a espécie de *Rhizobium*. Da mesma forma, SCHWINGHAMER e DUDMAN (1973) obtiveram perda parcial ou total da efetividade simbiótica em apenas 20% dos mutantes resistentes à espectinomicina.

Resistência à espectinomicina vem sendo, também, utilizada com frequência e considerada uma possível marca para suplementação à resistência à estreptomicina (BROCKWELL *et alii*, 1977; SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973). Como a estreptomicina, é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos, o qual interfere com a função de uma proteína na subunidade 30 S do ribossomo. Resistência à espectinomicina e estreptomicina não tem ocorrido de forma cruzada; têm sido obtidas em um único passo, estando os determinantes genéticos para o alto nível de resistência aos dois antibióticos, provavelmente, localizados próximos no cromossomo (SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973; JOHNSTON *et alii*, 1978). DAVIS (1962) verificou, em todos os grupos de inoculação de *Rhizobium*, diferentes graus de resistência a sulfas, isoniazidas, nistatina e penicilina. Mutantes resistentes a antibióticos, muitas vezes tornam-se insatisfatórios como marcadores, pois, além de alteração na efetividade, podem apresentar baixo nível de resistência, tornando-se marcas pouco nítidas (SCHWINGHAMER, 1964). Por outro lado, resistência in-

trínseca a baixas concentrações de vários antibióticos vem sendo utilizada como marcador genético por constituir-se propriedade estável da bactéria (JOSEY *et alii*, 1979).

Como relatado, a maioria dos estudos de resistência a antibióticos e quimioterápicos tem sido feita com culturas mantidas sob condições de laboratório. Padrões de resistência de população de *Rhizobium* nativa do solo, os quais possuem menor contato com essas drogas, são pouco investigados (HAGEDORN, 1979).

As informações concernentes aos graus de resistência a drogas por estirpes de *Rhizobium* parecem bastante diversificadas, mas poder-se-ia sugerir que três tipos de associação entre o modo de ação dos antimicrobianos e a efetividade simbiótica dos mutantes resistentes distinguir-se-iam: (1) resistência a inibidores de síntese proteica, associada com pouca ou nenhuma perda da efetividade; (2) resistência a inibidores de síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA) relacionada com frequente perda da atividade simbiótica, e (3) resistência a inibidores de síntese de parede e membrana celulares e modificadores da permeabilidade da membrana correlacionada à variável perda de efetividade (20 a 100%) (SCHWINGHAMER, 1967; SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973; PANKHURST, 1977).

Dentro desse contexto, os quimioterápicos classificar-se-iam, segundo o modo de ação, em: grupo I - antibióticos que afetam a síntese proteica, incluindo fase de ativação do aminoácido, ligação aos t-RNAs e incorporação do aminoácido na molécula proteica; Grupo II - inibidores da síntese de ácidos nucleicos, incluindo atuação na síntese de RNAs, DNAs ou ambos; Grupo III - interferentes da biossíntese e estrutura da parede celu

lar, atuando na formação de uridinopeptídeos precursores no ciclo lipídico e/ou na formação das conexões entre as cadeias decapeptídicas, e Grupo IV-interferentes da permeabilidade da membrana celular, desorganizando a complexa estrutura lipoproteica constituída de fosfolipídeos e glicídeos (LACAZ, 1969; PELCZAR JR.*et alii*, 1977). Segundo a constituição química básica dos quimioterápicos, poderia se considerar: classe dos aminoglicosídeos-aminociclitol, englobando um potente grupo de antibióticos de largo espectro de ação, cuja resistência pode ser eventualmente mediada por plasmídios (DAVIES e SMITH, 1978); classe dos macrolídeos, incluindo aqueles formados, parcialmente, por intermediários metabólicos simples, tais como acetato, propionato, malonato, etc., cuja biossíntese parece mediada, em geral, por sínteses de ácidos graxos saturados de cadeias longas (DAUM e LAMKE, 1979); e classe dos β -lactam, caracterizados pelo anel β -lactâmico, precursores biossintéticos das penicilinas e cefalosporinas (DAUM e LEMKE, 1979).

Apesar de poucas informações sobre as interações bioquímicas relacionadas ao complexo simbiótico *Rhizobium*-leguminosas, diversos fatores relacionados por PANKHURST (1977) devem ser considerados quando da determinação de um mecanismo de resistência a antibióticos de uma determinada estirpe de *Rhizobium* e sua efetividade simbiótica em um determinado hospedeiro. Primeiramente, diferenças genéticas básicas entre espécies e estirpes de *Rhizobium*, de crescimento rápido e lento, podem influenciar a amplitude da perda da efetividade. A base genética das mudanças na efetividade não é conhecida, mas sabe-se que o largo espectro de mutações, as quais alteram-na, sugere que a ação dos genes envolvidos no processo simbiótico pode ser modificada por mutação em outros loci, os quais normalmente não atuam nesse processo. Analogamente, reversão para efetividade, papel desempenhado por

genes supressores, é referido pela diversidade de deficiências nutricionais envolvidas (SCHWINGHAMER, 1969). Como segundo fator, considera-se que diferentes hospedeiros podem apresentar diferentes "ambientes celulares" nos nódulos, alterando a amplitude de perdas da efetividade simbiótica pelos mutantes (NUTMAN, 1946; PANKHURST, 1977).

2.1.2. Metais e pH

Estudos de Genética e Bioquímica da resistência a drogas em bactérias sugerem que a seleção, difusão e manutenção de microorganismos resistentes a essas substâncias podem ser consequência do uso indiscriminado desses agentes antimicrobianos (NAKAHARA *et alii*, 1977; SUMMERS e SILVER, 1978). Resistência a metais pesados pode estar associada a plasmídios, os quais, frequentemente, são também responsáveis pela resistência a antibióticos (CLARK *et alii*, 1977; SUMMERS *et alii*, 1978). Resistência a íons metálicos ocorre também em alta frequência em populações naturais de bactérias gram-negativas (SUMMERS *et alii*, 1978; SUMMERS e SILVER, 1978).

A concentração de metais pesados presentes no solo é relativamente baixa (Tabela 3), mas o acúmulo em cadeias biológicas pode alterar a seleção de resistência bacteriana (MARQUES *et alii*, 1979).

Assim, concentrações mais elevadas de metais pesados, tais como Cd, Ni, Cr, Zn, Pb, Hg, Vn, Co, Mn, Cu, Zn e Fe são consideradas provenientes de atividades industriais poluentes e até mesmo através do uso constante de fertilizantes (Tabela 4). No solo, a matéria orgânica pode conter metais pesados, bem como quelatos de alguns metais em contato com ela. Alguns desses quelatos são solúveis, podendo ser absorvidos por raízes de

TABELA 3 - Limites de concentrações totais e trocáveis de metais encontrados no solo.

	ppm											Referência
	Pb	Hg	Cd	Fe	Mn	Cu	Zn	Al	Cr	Ag	Ni	
total	40-70	0,01-0,5	0,8-3,4	10^4-10^5	20-3000	10-80	10-300	-	-	-	-	(1) (2)
Troc.	-	-	-	1100-3800	2,6-99,4	-	7-152	2-586	6,4-280	-	8,2-38,3	(3)

(1) MORTVERDT *et alii* (1972)

(2) OMAE (1979)

(3) MURRMANN *et alii* (1971); HOYT e NYBORG (1971a,b)

plantas, enquanto outros são insolúveis e não absorvíveis pelas mesmas. A capacidade de troca de cátions exprime a quantidade de cátions potencialmente trocáveis e utilizáveis pelas plantas, relacionando-se com absorção de metais pesados. Microorganismos podem influenciar, quimicamente, certos metais do solo, aumentando ou diminuindo suas quantidades (MURRMANN *et alii*, 1971). Em escala geológica, microorganismos podem desempenhar importante papel na chamada "biogeoquímica microbiana": transformações de metais não são limitadas ao crescimento de quimioautotrofos em ambientes adversos. Transformações microbianas de minerais metálicos podem ser divididas em duas grandes categorias: (a) conversão redox de formas inorgânicas, e (b) conversão de formas inorgânicas para orgânicas e vice-versa, tipicamente, metilação e demetilação. Mercúrio, cádmio e chumbo são considerados cátions metálicos tóxicos, principalmente quando metilados; ferro, manganês e outros são considerados cátions metálicos não tóxicos (SUMMERS e SILVER, 1978).

TABELA 4- Concentrações de Cd encontradas em fertilizantes (OMAE, 1979).

Fertilizante	Cd (ppm)
Superfosfato simples	50-170
Formulação NPK: 18-16-0 ^(*)	7,4-150
Formulação NPK: 0-46-0 ^(*)	86-114

(*) Análise de 11 amostras (IDAHO)

da resistência aos mesmos (Tabela 5), foram ainda pouco estudados em *Rhizobium*. Baixas concentrações de cobre inibem o crescimento de *R. meliloti* quando o cobalto também é baixo. Verifica-se também que baixas concentrações de zinco reduzem o crescimento do referido *Rhizobium*; interações de zinco com manganês têm sido observadas (HOLDING e LOWE, 1971). Os mesmos autores verificaram ainda que concentrações crescentes de Mn diminuíram efetividade simbiótica e aumentaram o tempo de geração da bactéria. Sherwood (1966), citada por HOLDING e LOWE (1971), observou grande variação na sensibilidade e eficiência simbiótica (redução do número de nódulos) de *Rhizobium* tolerante a Cu e Mn, sendo que nenhuma relação entre tolerância a Mn e efetividade foi observada. Tal fato é de considerável importância para solos ácidos, onde, possivelmente, altas concentrações de manganês são encontradas (HOLDING e LOWE, 1971).

Pressão de seleção de sais de metais pesados em solos pode favorecer a persistência de bactérias resistentes em diferentes microambientes e a presença de microorganismos portadores de fatores -R possibilitam condições de transferência da resistência (KELCH e LEE, 1978). Os efeitos dos cátions de metais pesados do solo estão relacionados quase que diretamente ao complexo ácido do solo, envolvendo concentração hidrogeniônica, reação do solo e acidez trocável. Acidez do solo é considerada um importante fator na ecologia do *Rhizobium* (VINCENT, 1962; NORRIS, 1965; HOLDING e LOWE, 1971; MUNNS, 1976; DATE, 1979; BROMFIELD e JONES, 1980; CALDWELL e WEBER, 1970; DRAPEAU *et alii*, 1973). Solos de baixo pH e altos teores de metais tóxicos cobrem extensas áreas de terra na América Latina, América do Sul, Oeste da América do Norte, Centro-Sul da África e Oeste da Ásia, onde aplicações de fertilizantes e calagem tornam-se imprescindíveis para colhei

TABELA 5 - Níveis naturais de resistência a metais pesados, encontrados em literatura, para diferentes espécies de bactérias.

Metal	Nível de Resistência (µg/ml)	Espécie	Referência
Al	0,68	<i>R. japonicum</i>	KEYSER & MUNNS (1979)
	1,35	<i>Rhizobium spp</i>	KEYSER & MUNNS (1979) KEYSER <i>et alii</i> 1979
	1,62	<i>Rhizobium spp</i>	MUNNS & KEYSER (1981)
Cd	3,00	<i>E. coli</i>	KHAZAELI & MITRA (1981)
	960,0 ⁽¹⁾	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979
Hg	< 1 - 5	<i>R. phaseoli</i>	CASSINI (1980)
	50	<i>E. coli</i>	CHARTONE-SOUZA (1975)
	7 ⁽¹⁾	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979
Fe	16 ⁽²⁾	<i>R. japonicum</i>	GROSS <i>et alii</i> 1979
Pb	1500,0 ⁽¹⁾	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979
Ni	32,0	<i>R. japonicum</i> ⁽³⁾	WELCH (1981)
Ag	80,0 ⁽¹⁾	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979
Cu	5,0	<i>R. japonicum</i> ⁽³⁾	VESPER (1978)
Zn	600,0	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979
Mn	200,0	<i>Rhizobium spp</i>	KEYSER & MUNNS (1979)
	25,0	<i>R. japonicum</i>	KEYSER & MUNNS (1979)
Cr	400,0	<i>P. aeruginosa</i>	MARQUES <i>et alii</i> 1979

(1) Valores para o sal, em meio sólido

(2) Nível do solo

(3) Em simbiose

tas produtivas (BOUTON *et alii*, 1981; GRAHAM e HUBBELL, 1974). A introdução de leguminosas nessas áreas dependeria, também, da fixação biológica de N_2 , cujo sucesso poderia ser comprometido pela reação ácida do solo (Tabela 6). Além do baixo pH, disponibilidade de fósforo, altos níveis de alumínio e manganês, frequentemente existentes nesses solos, concorreriam para afetar a nodulação e fixação de nitrogênio. Produção de álcali por *Rhizobium* de leguminosas tropicais e consequente aumento de pH na rizosfera, bem como o possível papel ecológico atribuído a este processo são bastante questionáveis (MUNNS, 1976; MUNNS *et alii*, 1979). Características coloniais, crescimento em leite litmus, precipitação em glicerofosfato de cálcio e utilização de fontes de carbono em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas tropicais foram semelhantes àsquelas de espécies simbiotes de regiões temperadas (MARTINEZ-DE DRETS e ARIAS, 1972; TRINICK, 1980). Contudo, pH alcalino não é considerado o principal fator pelo sucesso de estirpes de *Rhizobium*; efeito catiônico e viabilidade são notáveis em tais condições (UPCHURCH e ELKAN, 1977; VINCENT, 1977; GROSS *et alii*, 1979). Toxicidade a Al e acidez são, provavelmente, em solos ácidos, fatores mais importantes e limitantes do crescimento de *Rhizobium* que toxidez de Mn e deficiência de Ca (VINCENT, 1962).

Nesse particular, verifica-se que a quantidade de cálcio necessária para nodulação é maior que a exigida pelo *Rhizobium* e planta sozinhos (VINCENT, 1962; HOLDING e LOWE, 1971). Sabe-se que acidez e altas concentrações de alumínio reduzem a frequência de divisão celular, inibindo mitoses por indução de síntese de DNA metabolicamente instável e interferindo ainda com o metabolismo de ferro no núcleo (MUNNS e KEYSER, 1981; ALAM, 1981). As consequências da toxidez de Al ao *Rhizobium* constituiriam dimi-

TABELA 6 - Valores médios de pH para diferentes solos brasileiros (SANCHES, 1976).

Solo	Horizonte (cm)	pH	
		1:1H ₂ O	KCl 1N
Latosol	0 - 20	4,9	4,1
	200 - 230	4,9	4,3
Latosol Vermelho Escuro	0 - 35	4,8	4,2
	35 - 70	4,9	4,2
Latosol Vermelho Amarelo	0 - 20	4,9	4,4
	40 - 60	5,6	4,7
Terra Roxa Estruturada	0 - 20	6,3	5,4
	37-71	6,7	5,9

nuição da viabilidade, aumento da lag fase, redução da taxa de crescimento, resultando em declínio do número de nódulos (NUNNS *et alii*, 1979; NUNNS, 1968 e 1970) e implicando adaptação fisiológica ou seleção de variantes geneticamente tolerantes (KEYSER e MUNNS, 1979); MUNNS e KEYSER, 1981). Seleção de planta e *Rhizobium* para acidez e "stress" mineral (toxicidade a Al e Mn, principalmente) mostrou tolerância multigênica e herdável em *Medicago sativa* L. e *R. meliloti* (DEVINE *et alii*, 1976).

Espécies de *Rhizobium* diferem quanto à capacidade de tolerância a condições ácidas (DOBEREINER, 1966; KEYSER *et alii*, 1979; PEREIRA, 1979; BARBER, 1980). A Tabela 7 mostra os diferentes níveis de tolerância a pH encontrados para diversas espécies de *Rhizobium*. Foi também verificado que estirpes do grupo "cowpea" apresentam um largo espectro de tolerância a acidez do solo, sugerindo que em geral, *Rhizobium* desse grupo seja mais tolerante a acidez que espécies específicas (VINCENT, 1962; KEYSER *et alii*, 1979; DATE, 1979; GRAHAM e HUBBELL, 1974). Alguns autores presumiram que *Rhizobium* de crescimento lento, natural de solos ácidos (mais primitivos), produziram reação mais básica ou menos ácida que *Rhizobium* de crescimento rápido presentes em solos alcalinos e considerados ocupar posição filogenética mais avançada (NORRIS, 1965; BROCKWELL *et alii*, 1966; DAMIRGI *et alii*, 1967; KOWALSKI *et alii*, 1974; TRINICK, 1980). Contudo, não há evidências, em ecologia microbiana, referentes a organismos produzindo substâncias menos ácidas ou mais básicas para possibilitar-lhes adaptação a ambiente ácido (HOLDING e LOWE, 1971; BROMFIELD e JONES, 1980). Variação na produção alcali-ácida, tolerância a pH, Al e Mn verificam-se para espécies de crescimento rápido (GRAHAM e PARKER, 1964; GRAHAM, 1980, 1981; GRAHAM *et alii*, 1981), bem como para espécies de crescimento lento (DATE e HALLIDAY, 1979; KEYSER e MUNNS, 1979; KEYSER *et*

alii, 1979).

TABELA 7 - Níveis mínimos de tolerância a pH, encontrados em literatura, pa
ra *Rhizobium* spp.

Espécie	pH	Referências
<i>Rhizobium</i> spp	4,5	KEYSER e MUNNS (1979) MUNNS e KEYSER (1981)
	5,0 ^(*)	MUNNS <i>et alii</i> (1979)
<i>R. phaseoli</i>	4,5	GRAHAM <i>et alii</i> (1981)
<i>R. japonicum</i>	4,8	KEYSER <i>et alii</i> (1979)
<i>R. trifolii</i>	4,8	BROMFIELD e JONES (1980)
	5,1	HOLDING e LOWE (1971)
<i>R. meliloti</i>	5,0	BAKER (1980)
	5,3	HOLDING e LOWE (1971)
	5,7	RAKOTOARISOA <i>et alii</i> (1981)

(*) em simbiose

2.1.3. Genética da Associação Simbiótica

A família *Rhizobiaceae* contém apenas dois gêneros de bactérias - *Agrobacterium* e *Rhizobium*. As bactérias de ambos os gêneros são capazes de induzir multiplicação de células em plantas hospedeiras; espécies

do gênero *Agrobacterium*, em geral, induzem tumores ou proliferação anormal de células em raízes, enquanto espécies de *Rhizobium* induzem formação de nódulos em raízes de leguminosas, havendo especificidade nesta interação (JOHNSTON *et alii*, 1978; BROUGHTON, 1978). A capacidade de indução de tumores em *Agrobacterium* é controlada por grandes plasmídios de pesos moleculares entre 98 e 158 Mdaltos (VAN LAREBEKE *et alii*, 1974; WATSON *et alii*, 1975; GRESSHOFF *et alii*, 1979).

Fenotipicamente, a complexa associação *Rhizobium* - leguminosa é verificada pela presença de leghemoglobina localizada dentro do tecido nodular, pelo complexo da nitrogenase, o qual catalisa a redução de N_2 e diversos transportadores de elétrons ambos localizados dentro dos bacteróides nos nódulos. A planta contribui, essencialmente, com carboidratos fotossintéticos, os quais, provavelmente, passam aos bacteróides como açúcares em retorno, o vegetal recebe nitrogênio utilizável na forma de aminoácidos (PHILLIPS *et alii*, 1973; BURRIS, 1974; BRILL, 1979). Os fatores que estabelecem e mantêm tal sistema não são nitidamente conhecidos, mas, sabe-se que nem planta nem *Rhizobium* sozinhos possuem capacidade para produzir o sistema da nitrogenase (BALASSA, 1963; PHILLIPS *et alii*, 1973; HOLL, 1975).

A base genética do processo de nodulação e especificidade hospedeira é pouco conhecida mas, possivelmente, pelo menos, 5 regiões do grupo "nif" estejam envolvidas na síntese e regulação do sistema fixador de N_2 (POSTGATE, 1977). Por outro lado, o DNA da planta hospedeira carrega informação genética para codificar a apoproteína da leghemoglobina, parte da nitrogenase (DILWORTH e PARKER, 1969).

Muitas linhagens de *Rhizobium* carregam plasmídios, cujos pesos moleculares apresentam-se maiores que 90 Mdaltos (ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1976 e 1979; KOWALCZUK e LORKIEWICZ, 1977; NUTI *et alii*, 1977; JOHNSTON *et alii*, 1978; HIRCH, 1979; CASSE *et alii*, 1979; BEYNON *et alii*, 1980). Supondo-se que o cromossomo do *Rhizobium* seja de tamanho similar àquele de *E. coli* ou *P. aeruginosa*, a quantidade de informação genética extracromossômica é considerável (3 - 10%) (VAN LEREBEKE *et alii*, 1974). Evidências genéticas sugerem que alguns dos genes da bactéria envolvidos no processo simbiótico possam estar localizados em plasmídios (HIGASHI, 1967; DUNICAN e CANNON, 1971; DUNICAN e TIERNEY, 1974; BECHET e GUILLAUME, 1978; JOHNSTON *et alii*, 1978; GROSS *et alii*, 1979; ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1979). Pelo menos em *Rhizobium meliloti* nenhum gene controlando propriedades simbióticas tem sido mapeado no cromossomo (CASSE *et alii*, 1979; MAC NEIL *et alii*, 1978).

O significado biológico dos plasmídios (POSTGATE, 1977; DAVIES e SMITH, 1978) vem sendo ratificado por estudos genéticos, utilizando-se os processos de cura e transferência plasmidiais ou mesmo por mutação plasmidial através de inserção de transposons (CASSE *et alii*, 1979). Relacionado ao processo de cura, PRAKASH *et alii* (1979), citado por CASSE *et alii* (1979), verificaram que tratamento térmico produziu linhagens não nodulantes em *R. leguminosarum*, o qual mostrou perda de um plasmídio de peso molecular 110 Mdaltos. Tratamento com corantes acridina ou outros agentes de cura plasmidial possibilitaram perda da capacidade de nodulação em *Rhizobium* sp (HIGASHI, 1967; DUNICAN e CANNON, 1971).

DUNICAN e CANNON (1971) sugeriram, ainda, que compostos meta

licos ou fenólicos, possivelmente, presentes em solos ácidos, poderiam atuar como agentes eliminadores de plasmídios, contribuindo para o desenvolvimento de populações inefetivas de *Rhizobium* nesses solos, as quais, por outro lado, poderiam receber, por transferência plasmidial, efetividade de linhagens inoculadas. Construção de plasmídios (fatores R e F') que contêm gene "nif" bem como genes regulatórios, tem permitido a transferência de tais genes para outros organismos "nif deficientes" como *E. coli* e outros (POSTGATE, 1977; DUNICAN e TIERNEY, 1974; DIXON e POSTGATE, 1972; KOWALCZUK e LORKIEWICZ, 1977; DIXON e POSTGATE, 1971). Nesse particular, transferência inter e intra-específicas de material genético foram obtidas em *Rhizobium*; os mecanismos de recombinação utilizados são a transformação (BALASSA, 1963; RAINA e MODI, 1972; ELLIS *et alii*, 1962; SKOTNICKI e ROLFE, 1978), a transdução (KOWALSKI, 1971; SIK e OROSZ, 1971; KOWALSKI e DÉNAIRIÉ, 1972; BERINGER *et alii*, 1978) e a conjugação (HIGASHI, 1967; HEUMANN, 1968; BERINGER, 1974; DUNICAN e TIERNEY, 1974; JOHNSTON e BERINGER, 1977; KOWALCZUK e LORKIEWICZ, 1977; BERINGER *et alii*, 1978; JOHNSTON *et alii*, 1978).

Características fenotípicas não têm sido, ainda, definitivamente associada com a capacidade de fixação de nitrogênio codificada em genes plasmidiais, mas há evidências que produção de bacteriocinas e resistência a antibióticos possam estar ligadas a plasmídios (JOHNSTON *et alii*, 1978; KOWALCZUK e LORKIEWICZ, 1977; DUNICAN e CANNON, 1971; HARDY, 1975).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies e Estirpes de *Rhizobium* Utilizadas

3.1.1. *Rhizobium* spp

Foram utilizadas 9 estirpes de *Rhizobium* spp (grupo "cowpea") cujas origens, hospedeiros e eficiências relativas encontram-se na Tabela 8. Para esclarecer, o chamado grupo "cowpea" vem sendo constituído por estirpes de *Rhizobium* consideradas de nodulação não específica. Tal grupo é, taxonomicamente, bastante confuso e pode conter diferentes espécies de "promiscuidade" variável.

3.1.2. *Rhizobium phaseoli*

Foram utilizadas 10 estirpes de *R. phaseoli* (Tabela 9). Todas foram isoladas de *Phaseolus vulgaris*.

TABELA 8 - Estíopes de *Rhizobium* spp utilizadas.

Nº CENA	Número Original	Origem	Hospedeiro Original	Eficiência ^{a/} Relativa (%)
C-60	C-29	Km-47-RJ	<i>Centrosema pubescens</i>	65 (ZUTIN ^{b/})
C-62	C-101a	Km-47-RJ	<i>Centrosema pubescens</i>	66 (DE POLLI et alii, 1973)
C-63	C-102	Km-47-RJ	<i>Centrosema pubescens</i>	66 (DE POLLI et alii, 1973) 62 (STAMFORD, 1978)
C-69	P-101a	Km-47-RJ	<i>Glycine javanica</i>	62 (STAMFORD, 1978)
C-70	P-105a	Km-47-RJ	<i>Glycine javanica</i>	62 (LOPES et alii, 1974)
	SMS-147	Km-47-RJ	<i>Centrosema pubescens</i>	60 (ZUTIN ^{b/})
	SMS-292	Km-47-RJ	<i>Centrosema pubescens</i>	65 (ZUTIN ^{b/})
	IZ-1	IZ-Nova Odessa, SP	<i>Glycine wightii</i>	recém isolada
C-76	I-1a	Km-47-RJ	<i>Indigofera sp</i>	60 (FRANÇA et alii, 1973)

$$\frac{a/}{Efr} = \frac{\text{média mat.seca parte aérea planta inoculada}}{\text{média mat.seca parte aérea planta test.c/N}} \times 100 \quad (\text{BERGERSEN et alii, 1971})$$

^{b/} Comunicação pessoal de dados a serem publicados.

TABELA 9 - Estirpes de *Rhizobium phaseoli* utilizadas.

Nº CENA	Número Original	Origem	(*) Eficiência (**) Relativa (%)
C-01	C-01	Piracicaba-SP	39
C-05	C-05	Piracicaba-SP	41
C-14	C-14	Tietê-SP	45
C-29	127-K17	Nitragin-Co	36
C-37	CIAT-57	CIAT-Colômbia	15
C-40	CIAT-255	CIAT-Colômbia	57
C-88	SEMIA-487	IPAGRO-RS	53
C-100	CIAT-640	CIAT-Colômbia	25
C-105	CIAT-903 (TAL-182)	CIAT-Colômbia	55
C-114	4005	IPAGRO-RS	62

(*) $E_{fr} = \frac{\text{Média mat.seca parte aérea planta inoculada}}{\text{Média mat.seca parte aérea planta test.c/N}} \times 100$ (BERGERSEN *et alii*, 1971)

(**) Valores segundo SAITO *et alii* (1980)

3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1. Y M A (Yeast Manitol Agar) (FRED *et alii*, 1932)

Manitol	10 g
Glutamato de Sódio	0,5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,30 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
CaCl_2	0,40 g
Água de Levedura	100 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,0 g
Ágar	12 g
Água destilada	até 1000 ml
pH	6,8

O meio foi esterilizado por autoclavagem (uma atmosfera por 20 minutos). O YMB (Yeast Manitol Broth) foi preparado tal como YMA, excepto o ágar.

3.2.2. Meio modificado para pH (GRAHAM *et alii*, 1981)

K_2SO_4	131,00 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74,00 mg
K_2HPO_4	1,36 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,00 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,11 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,017 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,004 mg
Pantotenato de Ca	0,40 mg
Tiamina-HCl	0,40 mg
Biotina	0,001 mg
Glutamato de sódio	220,00 mg
Fe.EDTA	35,00 mg
Glicerol	5,00 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	até 1000 ml

O pH foi corrigido a 52°C para 4,5; 5,5 e 6,5

3.2.3. Água de Levedura (VINCENT, 1970)

100 g de fermento FLEISCHAMANN comercial foi suspenso em 1 litro de água quente. A suspensão ficou em repouso à temperatura ambiente por 1 a 2 horas e, a seguir, autoclavou-se por 40-60 minutos a uma atmosfera. O sobrenadante foi retirado e o líquido restante utilizado como água de levedura (pH 6,8).

3.2.4. Solução de Azul de Bromotimol

Solução alcoólica 0,5%, utilizada na quantidade de 5 ml por litro de meio de cultura.

3.2.5. Solução de Vermelho Congo

Solução aquosa 0,25%, utilizada na quantidade de 10 ml por litro de meio.

3.2.6. Solução Salina

Solução aquosa de cloreto de sódio 0,89% e autoclavada por 20 minutos a uma atmosfera.

3.2.7. Solução Tampão para Eletroforese (TEB)

Trizma base	107,779 gr
EDTA de sódio	8,405 gr
Ácido bórico	55,028 gr
Água bidestilada	1000 ml

A solução foi diluída 20 vezes antes do uso.

3.2.8. Solução Nutritiva para Planta (McKNIGHT, 1949)

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,93 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 gr
KH_2PO_4	5,0 gr
KCl	7,5 gr
Solução A-Z	25,0 ml
Solução D	25,0 ml
NaOH - 1N	17,5 ml (pH 6,4)
Água Destilada	1175 ml
Volume total	1250 ml

A solução foi diluída 20 vezes antes do uso.

Soluções Estoque:

A-Z:	H_3BO_3	2,86 gr
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,03 gr
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 gr
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 gr
	$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,09 gr
	Água Destilada	1000 ml
D:	$FeCl_3$ solúvel	16,8 gr
	EDTA Na. $2H_2O$	2,0 gr
	Água Destilada	1000 ml

3.2.9. Sublimado Corrosivo

$HgCl_2$	20 gr
HCl	50 ml

Para esterilização de nódulos, diluiu-se 2,5 ml da solução citada em 1000 ml de água esterilizada (0,25%). Eventualmente, os nódulos foram esterilizados em água oxigenada 10%.

Para esterilização de sementes, diluiu-se 5 ml da solução em 1000 ml de água esterilizada (0,25%).

Após as esterilizações, o material foi lavado 6 a 7 vezes, com água esterilizada.

3.3. Drogas Utilizadas

3.3.1. Antimicrobianos Utilizados

A Tabela 10 traz os antimicrobianos utilizados, bem como suas constituições químicas básicas, modo de ação e fabricante.

3.3.2. Sais de Metais Utilizados

Os sais de metais utilizados no presente trabalho estão relacionados na Tabela 11.

TABELA 10 - Constituições químicas, modos de ação e fabricantes dos antimicrobianos utilizados.

Antibiótico	Constituição Química (*)	Modo de Ação (*)	Laboratório
Ampicilina (Ap)	β -lactamas	Inibição de síntese da parede celular	Fontoura-Wyeth
Ácido Nalidixico (AN)	quimioterápico	Inibição da síntese de DNA	Sigma
Carbenicilina (Cc)	β -lactamas	Inibição de síntese da parede celular	Pfizer
X Cloranfenicol (Cl)	2-amino 1,3 propanodiol	Interferente da síntese proteica	Parke-Davis
X Eritromicina (Em)	heterosídeo macrolídico	Interferente da síntese proteica	Lederle
X Espectinomicina (Sp)	Aminoglicosídeo Aminociclitol	Interferente da síntese proteica	Upjohn
X Estreptomicina (St)	Aminoglicosídeo Aminociclitol (sulfato)	Interferente da síntese proteica	Fontoura-Wyeth
X Kanamicina (Kn)	Aminoglicosídeo Aminociclitol	Interferente da perm. da membrana	Bristol
Neomicina (Nc)	Aminoglicosídeo Aminociclitol (sulfato)	Interferente da perm. da membrana celular	Sigma
Polimixina B (Pc)	Peptídeo (sulfato)	Interferente da perm. da membrana celular	ICN Pharmaceuticals
X Tetraciclina (Tc)	Hidrocarboneto Aromático	Interferente da síntese proteica	Majer
Vancomicina (Vc)	Aminoglicosídeo Aminociclitol	Inibição da sínt. parede celular	Lilly

(*) LACAZ (1969); PELCZAR *et alii* (1977)

TABELA 11 - Pesos moleculares, porcentagens do elemento e solubilidade dos sais de metais utilizados.

Sal	P.M.	% Elemento	Solubilidade em 100 Partes (*)	
			Água - °C	Água-100°C
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	666,45	8,10	86,9	1104,0
ZnSO_4	161,45	40,26	42,0	61,0
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	280,89	21,00	63,5	117,8
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	294,22	35,35	4,9	80,0
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	331,23	62,49	38,8	138,8
AgNO_3	169,89	63,57	122,0	952,0
KBrO_3	167,02	47,90	3,1	49,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,69	25,23	24,3	205,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,03	20,14	32,8	149,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,02	32,54	98,4	79,8
$\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	228,36	49,05	168,0	180,0
HgCl_2	271,52	73,67	3,6	61,3

(*) Segundo HANDBOOK OF CHEMISTRY (LANGE, 1961)

3.4. Soluções Estoques das Drogas

As soluções da maioria dos antibióticos foram preparadas com água esterilizada, sendo pesados 100 mg e adicionados a 10 ml de água. As drogas cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina tiveram suas solubilizações iniciadas com 1 ml de álcool metílico, o ácido nalidixico foi dissolvido em 1 ml de NaOH 0,1N, em seguida foram completados com 9 ml de água. Todas as soluções estoques tiveram uma concentração final de 10 mg/ml.

As soluções estoques de todos os sais de metais foram feitas com água esterilizada como solvente a uma concentração final de 10 mg/ml, sempre abaixo do limite de solubilidade dos respectivos sais.

3.5. Determinação dos Níveis Naturais de Resistência às Drogas, Tolerância a Baixo pH e Isolamento de Mutantes Resistentes

Os níveis de resistência foram obtidos utilizando-se o método de diluição em placas contendo concentrações crescentes de cada droga: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg/ml de meio de cultura (YMA). A partir das soluções estoques, fizeram-se as diluições, adicionando-se quantidades adequadas a 20 ml de meio de cultura a 45°C, tal como indicado na Tabela 12.

As estirpes de *Rhizobium* utilizadas foram crescidas em tubos com 5 ml de meio líquido (YMB) até a fase logarítmica. A seguir, foram transferidas para as placas, contendo dosagens das drogas, através de um replicador multi-alça (AZEVEDO *et alii*, 1980). Após o período de incubação

TABELA 12 - Quantidades e diluições utilizadas para obtenção de diferentes concentrações de drogas no meio de cultura.

Concentração Final da Droga na Placa ($\mu\text{g/ml}$)	ml da Solução da Droga/ Placa	Diluição da Solução da Droga
1	0,2	10^{-2}
2	0,4	10^{-2}
5	1,0	10^{-2}
10	2,0	10^{-2}
20	0,4	10^{-1}
40	0,8	10^{-1}
50	1,0	10^{-1}
100	2,0	10^{-1}
200	0,4	s/d
500	1,0	s/d
1000	2,0	s/d

de 6 dias a 28°C, anotou-se o crescimento das colônias (17 por placa) comparando-se com uma placa controle isenta das drogas. Foram feitas 3 repetições em tempos diferentes. A caracterização dos níveis de tolerância a baixo pH foi feito tal como a determinação da resistência às drogas; nesse caso, entretanto, a incubação se deu em meio modificado para pH. Considerou-se como nível de resistência a concentração imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento das colônias. Os valores foram anotados em relação à concentração do elemento ($\mu\text{g/ml}$) e não do sal, sendo os mesmos calculados por estequiometria. O alumínio trocável (Al^{3+}) do meio sólido foi determinado pela Seção de Fertilizantes e Fertilidade do Solo - CENA, Piracicaba, SP, segundo BARRETO *et alii* (1979).

O isolamento dos mutantes naturais simples e duplos resistentes à estreptomicina e/ou espectinomicina foi feito em placas contendo 250 $\mu\text{g/ml}$ dos antibióticos. Os mutantes duplos foram isolados partindo-se dos mutantes simples resistentes à espectinomicina.

3.6. Isolamento de Bactérias de Nódulos

Destacados os nódulos das plantas, estes foram esterilizados superficialmente por imersão rápida em Etanol, posteriormente em sublimado corrosivo (0,25%), por 3 minutos e, finalmente, lavados em água esterilizada. Em seguida, os nódulos foram esmagados e a suspensão semeada em YMA adicionado de Azul de Bromotimol (observação da produção álcali-ácida). As colônias obtidas foram transferidas para YMA + vermelho congo, onde colônias típicas do *Rhizobium* se diferenciam por não absorverem visivelmente o corante. As colônias foram também, observadas morfológicamente - translúcidas, achatadas e arredondadas, e microscopicamente - células pleiomórficas (0,6-0,8 x 2,5-4,0 μ) com movimento flagelar.

3.7. Curvas de Crescimento de Estirpes de *Rhizobium* Selvagem e Resistente a Antibióticos

Células de uma estirpe selvagem e uma resistente duplo a estreptomicina e espectinomicina foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de YMB a 28°C com agitação constante. Após a semeadura inicial (tempo 0), outras tantas foram feitas em intervalos não regulares, obtendo-se, assim, o número médio de células a cada tempo. Simultaneamente à semeadura, foi feita determinação turbimétrica (valores em % de absorbância) em espectrofotômetro. ($\lambda = 550 \text{ nm}$) para cada tempo observado.

Os valores $\log n^\circ$ médio de células e % de absorbância em função do tempo (horas) foram utilizados para construção da curva de crescimento a partir da qual foi calculado, também, o tempo de geração segundo a relação:

$$\frac{\log_{10} N_1 - \log_{10} N_0}{\log^2 (t_1 - t_0)} = n^\circ \text{ gerações/hora}$$

$$\text{T.G.} = 1/n^\circ \text{ ger/hora} = 1 \text{ H. } (n^\circ \text{ ger.}) \cdot 10^{-1}$$

onde, N_1 = n° de células obtidas no tempo 1

N_0 = n° de células obtidas no tempo 0

t_1 = intervalo de tempo (horas) dentro da fase logarítmica de crescimento

T.G. = tempo, em horas, para obtenção de uma geração de células.

3.8. Ensaio de Nodulação em Casa-de-Vegetação

Para tanto, utilizaram-se inicialmente vasos de Leonard modificado (VINCENT, 1970), os quais constituíram-se de duas partes: dois recipientes acoplados, contendo, o inferior, 700 ml de solução nutritiva (Mc KNIGHT, 1949) e o superior areia + vermiculita (1:2) em contato com a solução nutritiva por capilaridade. O conjunto foi autoclavado a 120°C por 2 horas e, em seguida, colocadas as sementes, mantendo-se ao final 2 plantas por vaso. A inoculação do *Rhizobium* foi feita por ocasião do desbaste.

A nodulação foi avaliada, também, em vasos contendo 5 kg de solo parcialmente esterilizado. A planta utilizada foi *Vigna unguiculata* e as variáveis analisadas foram: peso da matéria fresca da parte aérea (g/planta) e peso fresco de nódulos (g/planta).

3.9. Avaliação da Infectividade

Esta avaliação foi feita através de coleta de nódulos de plantas inoculadas com estirpes mutantes de *Rhizobium* spp., incluindo selvagens resistentes simples e duplos a espectinomicina e/ou estreptomicina. A produção de nódulos foi obtida em *Vigna unguiculata* cultivada em vasos com solo por 42 dias com 5 repetições. A inoculação parcialmente estéril foi feita com cultura líquida por ocasião do desbaste. Dos nódulos obtidos foram reisoladas estirpes de *Rhizobium* em meio de cultura contendo estreptomicina e/ou espectinomicina e sem antibiótico. As porcentagens de infectividade dos mutantes foram obtidas considerando 100% para o crescimento nas placas sem antibiótico.

3.10. Atividade da Nitrogenase

A atividade da Nitrogenase dos nódulos foi feita através da redução do Acetileno em Etileno e o Etileno detectado em cromatógrafo a gás. Assim, após a colheita das plantas, as raízes foram cortadas na região do colo e colocadas, imediatamente, em frascos de 250 ml. Nesses frascos, hermeticamente fechados, foram retirados 25 ml de ar e injetados o mesmo volume de Acetileno. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, amostras de 0,5 ml foram retiradas do frasco e analisadas pelo cromatógrafo BECKMAN G C Modelo 65. Os cálculos da atividade da Nitrogenase foram realizados segundo a fórmula:

$$C_e = L \times A \times K$$

onde: C_e = concentração do Etileno evoluído

L = leitura da amostra

A = atenuação

K = fator de correção das amostras

O fator K foi calculado tal como:

$$K = K' \cdot 1/\text{tempo incubação} \cdot 1/\text{volume injetado} \cdot \text{volume frasco}$$

sendo K' o fator de correção do padrão injetado determinado por:

$$K' = \frac{\text{Concentração de Etileno}}{L.R.}$$

onde: L = leitura do padrão (500 ppm C_2H_4)

R = "Range" do cromatógrafo

Volume do Etileno Injetado = $0,5 \times 10^{-3}$ /ml do padrão

3.11. Separação de DNA Extracromossômico em Gel de Agarose (LEMOS,1980)

Células das linhagens de *Rhizobium* utilizadas foram crescidas em YWB a 28°C até a fase logarítmica. Em seguida, foram centrifugadas, lavadas duas vezes em tampão TEB, suspensas em 1,0 ml de TEB e submetidas a eletroforese vertical em aparelho apropriado, utilizando-se TEB como tampão de corrida. Anterior à coloração das amostras bacterianas nas canaletas das placas de gel de agarose 0,8%, as mesmas (10-15 µl) foram misturadas com 30 µl de uma solução TEB contendo ficoll 400.000 a 20%, 1 µg/ml de ribonuclease e 300 µl/ml de azul de bromofenol. A lise foi, então, conseguida com a adição de 30 µl de TEB contendo 0,2% de SDS e 10% de ficoll 400.000. Após a mistura das duas camadas com auxílio de um palito, o volume lisado de cada canaleta foi duplicado com a adição de TEB contendo 0,2% de SDS e ficoll 400.000 a 5%. As canaletas das placas de gel foram seladas com agarose a 0,8% e o tampão de eletroforese foi colocado nos compartimentos do aparelho para eletroforese vertical. Após uma corrida inicial de 45 minutos, a 4 mA, aumentou-se para 45 mA por 20 minutos, ou tempo suficiente para que o corante chegasse ao outro extremo da placa. Terminada a migração, as placas de gel foram colocadas em solução de brometo de etídeo (1 µg/ml) em TEB e coradas durante 30 minutos. As descolorações foram feitas durante 15 minutos em água corrente. As observações dos géis foram feitas com luz ultra-violeta de ondas curtas. O gel foi fotografado com filme KODAK TRI x PAN, com filtro NIKON tipo 052.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação do Al Trocável

A quantidade de cátions metálicos liberados no meio sólido pode depender do estado do íon com respeito a ligantes quelantes (PICKETT e DEAN, 1979). Assim foi feita determinação da quantidade de Al trocável no meio de cultura sólido, segundo diferentes concentrações do sal $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ adicionado ao referido meio. A Figura 1 mostra a curva de liberação do Al^{3+} no meio sólido.

TABELA 13 - Determinação do Al trocável em meio de cultura sólido, segundo diferentes concentrações de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ adicionadas.

$\mu\text{g/ml}$ de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ Adicionado	$\mu\text{g/ml}$ do Al^{3+} Liberado	$\mu\text{g/ml}$ do Al^{3+} Total
0	-	0,9
100	0,5	1,4
200	0,6	1,5
500	0,8	1,7
1000	1,3	2,2

Fig. 1 — Curva de liberação de Al trocavel em meio de cultura solido em função de concentrações crescentes de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$

4.2. Níveis Naturais de Resistência a Drogas e a pH

Os resultados dos níveis de resistência a antimicrobianos e a metais pesados para *Rhizobium phaseoli* encontram-se nas Tabelas 14 e 16 e para *Rhizobium* spp (grupo "cowpea"), encontram-se nas Tabelas 15 e 17. A Tabela 18 confronta os limites dos níveis de resistência a metais encontrados no trabalho e alguns da literatura para os dois grupos de estirpes utilizadas. Os gráficos (frequência x concentração da droga) da distribuição dos níveis de resistência natural aos antimicrobianos utilizados encontram-se nas Figuras 2 e 3.

Os níveis de tolerância a baixo pH para os dois grupos acham-se na Tabela 19.

4.3. Isolamento de Mutantes Resistentes a Antibióticos e Curvas de Crescimento

Foram isolados mutantes simples e duplos resistentes a estreptomicina e/ou espectinomicina da estirpe C-62 do grupo "cowpea". Os mutantes simples foram obtidos nas frequências $17,0 \cdot 10^{-7}$ e $5,6 \cdot 10^{-7}$ para estreptomicina e espectinomicina, respectivamente. Os tempos de geração (T.G.) para as estirpes C-62 selvagem e C-62 $\text{spc}^+ \text{str}^+$, estimados tal como no item 3.7, foram $\text{TG}_{\text{C-62}} = 5,6$ horas e $\text{TG}_{\text{C-62spc}^+ \text{str}^+} = 7,7$ horas.

Os valores de contagens de células, de redução a uma célula bem como das leituras do espectrofotômetro encontram-se na Tabela 20. A representação gráfica das curvas encontra-se na Figura 4, sendo uma função do logaritmo do número de redução a uma célula x tempo (horas).

TABELA 14 - Níveis naturais de resistência a antimicrobianos ($\mu\text{g/ml}$) de estirpes de *Rhizobium phaseoli*

Estirpes	Antimicrobianos (µg/mL) (*)											
	EM	Ap	Sp	St	Cl	Kn	Tc	Cc	Vc	Nc	Pc	An
C-37	1	5	5	2	10	5	1	20	2	2	20	50
C-100	10	1	2	1	1	20	1	2	20	2	20	100
C-114	2	5	2	5	40	20	1	20	2	2	50	200
C-05	2	5	5	2	20	5	1	40	2	2	50	200
C-14	5	1	10	1	10	1	1	50	50	2	50	200
C-40	5	5	5	5	40	5	1	40	5	2	40	40
C-01	2	1	5	1	2	5	1	2	5	2	50	50
C-29	50	1000	50	20	20	50	2	1000	200	50	1000	10
C-88	50	100	20	2	100	5	2	50	100	20	10	20
C-105	2	2	10	5	20	2	1	20	2	2	50	200

(*) Para abreviação, ver pág. 34.

TABELA 15 - Níveis naturais de resistência a antinicrobianos ($\mu\text{g/ml}$) para estúrpes de *Rhinobium* spp.

Estirpes	Antimicrobianos (µg/mL) (*)											
	EM	Ap	Sp	St	CL	Kn	Tc	Cc	Vc	Nc	PL	An
C-62	10	20	10	10	20	1	10	50	100	5	100	100
C-69	10	50	20	10	20	1	10	50	100	5	100	200
C-60	10	20	5	50	20	5	5	50	100	5	100	200
C-63	5	20	20	50	1	1000	2	50	100	5	100	500
IZ-1	10	50	20	20	50	1	10	100	100	5	100	200
C-76	10	50	20	50	50	1	10	100	100	5	100	200
C-70	20	50	5	20	50	1	10	100	100	5	100	200
SMS-147	5	20	10	50	20	5	5	50	100	10	100	200
SMS-292	20	20	10	50	20	5	5	50	100	20	100	200
C-62 spc ⁺ str ⁺	10	20	1000	1000	50	2	5	100	100	20	100	200

(*) Para abreviações, ver pág. 34.

TABELA 16 - Níveis naturais de resistência a metais ($\mu\text{g/ml}$), encontrados para estúrpes de *R. phaseoli* em meio sólido.

Estirpes	Metais (µg/ml)										
	Al ³⁺ (*)	Hg ²⁺	Fe ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Ag ⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Cr ₂ O ₇ ²⁻
C-37	1,7	1	100	100	0,4	1	10	1	8	300	1
C-100	1,7	1	100	100	1,0	1	5	1	8	300	1
C-114	1,7	1	100	100	4,0	1	2,5	1	8	300	1
C-05	1,7	1	100	100	4,0	1	2,5	1	4	300	1
C-14	1,7	1	100	200	4,0	1	2,5	1	8	300	1,75
C-40	1,7	1	100	100	4,0	1	10	5	8	300	1
C-01	1,7	1	100	100	8,0	1	10	1	8	300	1
C-29	1,7	1	100	200	4,0	1	12,5	10	40	300	7
C-88	1,7	1	100	100	4,0	1	12,5	1	8	300	1
C-105	1,7	1	100	100	0,4	1	12,5	1	8	300	1

(*) valor calculado analiticamente.

TABELA 17 - Níveis de resistência a metais ($\mu\text{g/ml}$), encontrados em estirpes de *R. spp.*, em meio sólido.

Estirpes	Metais (µg/mL)										
	Al ³⁺ (*)	Hg ²⁺	Fe ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Ag ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Cr ₂ O ₇ ²⁻
C-62	1,7	1	100	60	4	1	5	5	80	300	1
C-69	1,7	1	100	60	4	1	5	5	80	300	1
C-60	1,5	1	100	30	4	1	2,5	5	50	300	1
C-63	1,45	1	40	30	2	1	1	10	30	150	1
C-62 spc str ⁺	1,7	1	100	60	4	1	5	5	80	300	1
IZ-1	1,7	1	100	60	4	1	5	5	80	300	1
C-76	1,7	1	100	60	4	1	5	5	80	300	1,75
C-70	1,7	1	100	60	4	1	5	2,5	80	300	1,75
SMS-147	1,7	1	100	30	4	1	5	5	80	300	1
SMS-292	1,5	1	100	30	2	1	5	5	80	300	1

(*) valor calculado analiticamente.

TABELA 18 - Limites dos níveis de resistência dos metais utilizados para as estirpes de *R. phaseoli* e *Rhizobium* spp.

Metal	<i>R. phaseoli</i> (µg/ml)	<i>Rhizobium</i> spp (µg/ml)
Al	1,7	1,5-1,7 (1,35-1,62) (*)
Hg	1,0 (1,5) (*)	1,0
Fe	100,0	40,0-100,0
Pb	100,0-200,0	30,0-60,0
Ni	0,4-8,0	2,0-4,0
Ag	1,0	1,0
Cu	2,5-12,5	1,0-5,0
Cd	1,0-10,0	2,5-10,0
Zn	4,0-40,0	30,0-80,0
Mn	300,0	150,0-300,0 (200) (*)
Cr	1,0-7,0	1,0-1,75

(*) valores de literatura.

Figura2 — Distribuição gráfica dos níveis de resistência natural a diversas drogas em estirpes de Rhizobium spp (grupo "cowpea") e Rhizobium phaseoli utilizadas.

Figura 3— Distribuição gráfica dos níveis de resistência natural a diversas drogas em estirpes de Rhizobium spp (grupo "cowpea") e Rhizobium phaseoli utilizadas.

TABELA 19 - Níveis naturais de tolerância a pH, em meio sólido, para as estirpes de *R. phaseoli* e *Rhizobium* spp utilizadas.

<i>R. phaseoli</i>		<i>Rhizobium</i> spp	
Estirpes	pH	Estirpes	pH
C-01	6,5	C-60	4,5
C-05	5,5	C-62	4,5
C-14	4,5	C-62 spc ⁺ str ⁺	4,5
C-29	5,5	C-63	5,5
C-37	4,5	C-69	4,5
C-40	4,5	C-70	4,5
C-88	4,5	C-76	5,5
C-100	5,5	IZ-1	4,5
C-105	5,5	SMS-147	4,7
C-114	5,5	SMS-292	4,5

TABELA 20 - Contagem do número de células viáveis em função do tempo e valores de absorbância espectrofotométrica para as estirpes C-62 e C-62 $spc^+ str^+$ de *Rhizobium* spp.

Tempo (horas)	C-62				C-62 $spc^+ str^+$			
	Valor Obtido	Redução a 1 cél.	Log Nº cél.	% Absorb. (550 nm)	Valor Obtido	Redução a 1 cél.	Log Nº cél.	% Absorb. (550 nm)
0,0	$15,5 \cdot 10^{-2}$	1	0	3,6	$3,1 \cdot 10^2$	1	0	3,6
20,0	$17,7 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^1$	1,06	10,2	$21,7 \cdot 10^2$	$0,7 \cdot 10^1$	0,85	4,8
25,0	$26,1 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^1$	1,23	12,2	$9,2 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^1$	1,48	11,4
42,5	$28,5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^2$	2,26	16,4	$12,3 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^2$	2,61	14,5
47,0	$11,9 \cdot 10^5$	$7,7 \cdot 10^2$	2,89	19,4	$59,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^3$	3,29	20,1
48,5	$15,0 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^2$	2,98	20,2	$84,0 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^3$	3,43	21,0
49,5	$30,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^3$	3,20	21,0	$2,0 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^5$	4,85	31,2
66,0	$23,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^4$	4,18	41,2	$4,0 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$	5,11	38,6
72,0	$51,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^4$	4,52	52,6	$19,0 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^5$	5,74	40,2
90,0	$45,0 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^5$	5,46	61,5	$82,0 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	6,43	54,9
96,0	$20,0 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^7$	7,11	75,0	$6,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$	6,30	53,8
100,0	$24,9 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^7$	7,20	78,0	$15,0 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^6$	6,69	58,9
210,0	$27,9 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^7$	7,26	79,6	$3,7 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^7$	7,08	70,6
297,5	$16,1 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^7$	7,02	73,3	$7,3 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	68,8
317,0	$11,2 \cdot 10^9$	$0,7 \cdot 10^7$	6,86	72,5	$4,3 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^7$	7,15	68,2

Fig. 4 — Curvas de crescimento de estirpes selvagem e mutante resistente a antibióticos para estirpe C-62 de Rhizobium spp

4.4. Avaliação da Infectividade e Efetividade de Estirpes Selvagens e Mutantes de *Rhizobium* spp.

O estabelecimento da relação simbiótica entre *Rhizobium* e leguminosa é dependente de duas características gerais: a bactéria deve ser capaz de penetrar na raiz e induzir o desenvolvimento de nódulos (infectividade) e, posteriormente, participar da interação bioquímica planta-bactéria, levando à fixação de nitrogênio atmosférico (efetividade). A efetividade, frequentemente, é medida pela atividade da nitrogenase, principal enzima no processo de redução do N_2 atmosférico.

Assim, a Tabela 21 traz medidas avaliativas da infectividade para a estirpe C-62 de *Rhizobium* spp e derivativos mutantes resistentes a antibióticos.

TABELA 21 - Valores avaliativos da infectividade e efetividade de estirpes de *Rhizobium* spp C-62 selvagem, mutantes simples e duplos resistentes a antibióticos inoculadas em *Vigna unguiculata*, cultivada em solo por 42 dias (médias de 5 repetições).

Estirpe	Matéria Fresca (g/planta)	N_2 -ase (n moles C_2H_4 /planta.h)	Nódulo Fresco (g / planta)	% Inf.
C-62	3,60	262	0,16	100
C-62 str ⁺	3,41	114	0,14	54,0
C-62 str ⁺ spc ⁺	2,89	69	0,13	26,0

4.5. Eletroforese em Gel de Agarose para Separação de DNA Extracromossômico

As Figuras 5, 6 e 7, a seguir, mostram os perfis de migração eletroforética vertical em gel de agarose do DNA para as estirpes de *Rhizobium* spp e *R. phaseoli*. As bandas centrais referem-se ao DNA cromossômico e as demais ao DNA extracromossômico.

Apresentam-se pela Figura 5 os perfis a, b, c, d, e, f, g, h, i, j e k, correspondentes às estirpes C-40, C-100, C-29, C-05. SMS-147, C-37, C-76, C-62, SMS-292, C-69 e C-14, respectivamente. Verificaram-se que as estirpes C-100 (*R. phaseoli*), C-29 (*R. phaseoli*), SMS-147 (*Rhizobium* spp), C-76 (*Rhizobium* spp) e C-69 (*Rhizobium* spp) apresentaram bandas plasmidiais, incluindo diferentes pesos moleculares.

A Figura 6 mostra o padrão de migração da estirpe C-88 (*R. phaseoli*) em todas as canaletas, onde observa-se a presença de uma banda extracromossômica. A Figura 7, onde verificam-se os perfis referentes às estirpes, (a) C-60 (*Rhizobium* spp), (b) C-114 (*Rhizobium* spp) (c) C-62 spc⁺ (*Rhizobium* spp), (d) IZ-1 (*Rhizobium* spp), (e) C-63 (*Rhizobium* spp), e (f) C-70 (*Rhizobium* spp), não apresentou banda de DNA extracromossômico. A estirpe C-105 (*R. phaseoli*) não foi submetida à eletroforese.

As ordens dos pesos moleculares referidas nas Figuras 5 e 6 são estimativas grosseiras, obtidas de forma indireta através de curva padrão determinada por LEMOS (1980).

FIGURA 5 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium* spp (grupo "cowpea"), mostrando a presença de bandas de DNA plasmidial de pesos moleculares estimados entre 10^6 e 10^8 Daltons. (a) lisado de *R. phaseoli* C-40; (b) lisado de *R. phaseoli* C-100; (c) lisado de *R. phaseoli* C-29; (d) lisado de *R. phaseoli* C-05; (e) lisado de *Rhizobium* spp SMS-147; (f) lisado de *R. phaseoli* C-37; (g) lisado de *Rhizobium* spp C-76; (h) lisado de *Rhizobium* spp C-62; (i) lisado de *Rhizobium* spp SMS-292; (j) lisado de *Rhizobium* spp C-69 e (k) lisado de *R. phaseoli* C-14.

FIGURA 6 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para 9 lisados de *Rhizobium phaseoli* C-88, carregando uma banda de DNA plasmidial (P.M. $\approx 10^8$ Daltons).

FIGURA 7 - Eletroforese de DNA em gel de agarose para *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium* spp (grupo "cowpea". (a) lisado de *Rhizobium* spp C-60; (b) lisado de *R. phaseoli* C-114; (c) lisado de *Rhizobium* spp C-62 $spc^+ str^+$; (d) lisado de *Rhizobium* spp IZ-1; (e) lisado de *Rhizobium* spp C-70.

5. DISCUSSÃO

5.1. Determinação do Alumínio Trocável

Níveis extremamente altos de resistência natural ao sulfato de alumínio obtidos, inicialmente, levou à investigação dos teores catiônicos do alumínio do meio de cultura adicionado do sal. Analiticamente observou-se, pois, que doses altas de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ correlacionara a doses muito baixas de Al^{3+} , sendo detectado, inclusive, Al^{3+} no meio de cultura sólido sem adição do referido sulfato. Especulativamente, pode-se dizer que o meio apresenta substâncias iônicas e/ou quelantes capazes de reter, de alguma forma, o referido cátion. Nesse particular, STRANDBERG *et alii* (1981) discutem que a disponibilidade e absorção de cátions de metais pesados, por microorganismos, podem variar com o pH, temperatura, íons metálicos interferentes (Ca, por exemplo) e compostos químicos (carbonato de amônia, HgCl_2 , formaldeído, etc.). O ágar do meio sólido pode interferir, funcionando como ligante quelante (PICKETT e DEAN, 1979). Exemplificando, em Enterobactérias, níveis variáveis de resistência a Hg para uma mesma linhagem foram observados por OLIVEIRA (1980), sugerindo, portanto, que fatores como os referidos poderiam estar envolvidos na disponibilidade do cátion.

A liberação do Al^{3+} segundo concentrações crescentes de $Al_2(SO_4)_3$ adicionados (Figura 1) se deu sob função linear. Pode-se dizer, portanto, que abaixo do limite de solubilidade do sal (Tabela 11), sua dissociação deva ser normal.

Considerando os aspectos citados, pode-se inferir que o uso de sais em solução deve observar os limites de solubilidade e os possíveis interferentes do meio ao qual é adicionado para que, quantitativamente, os resultados não sejam mascarados.

5.2. Níveis Naturais de Resistência a Antimicrobianos

Os níveis de resistência encontrados situaram-se, em geral, dentro dos limites observados na literatura (Tabela 2). Para estirpes de *Rhizobium spp* (grupo "cowpea") não foram verificadas variações nos níveis de resistência dentro de estirpes (Tabela 16), porém, alguns padrões diferiram daqueles da literatura: níveis mais altos foram obtidos para espectinomicina, vancomicina e ácido nalidixico e mais baixos para kanamicina, tetraciclina e neomicina. Para ampicilina, bem como para carbenicilina, não foram encontrados valores na literatura, sugerindo que tais resultados foram obtidos pela primeira vez. Resistências iguais ou superiores a 100 µg/ml foram observadas para carbenicilina, vancomicina, polimixina e ácido nalidixico. Notam-se que esses três primeiros antibióticos, apesar de apresentarem constituições químicas distintas, atuam ao nível de membrana e parede celulares, alterando a síntese ou permeabilidade da mesma. Os antibióticos interferentes da síntese de parede celular podem causar, nas células sensíveis, acúmulo de uridina difosfato, muramyl peptídeos, precursores da sín

tese de parede celular; alguns deles podem induzir formação de esferoplasmas em solução hipertônica e muitos bloqueiam a incorporação mucopeptídica em diferentes passos na síntese da referida parede (SCHWINGHAMER, 1967). Há casos, onde um antibiótico suficientemente parecido com um nutriente normal da célula, pode ser absorvido pelo sistema de transporte de nutriente. Por ligação com o ribossomo, alguns aminoglicosídeos são capazes de induzir um sistema de transporte normal de poliamina, o qual, casualmente, promove acúmulo adicional do aminoglicosídeo (CHOPRA e HOWE, 1978). Por outro lado, níveis de resistência natural menores ou iguais a 5 µg/ml foram obtidos para kanamicina, neomicina e tetraciclina. Entre as estirpes de *R. spp* destacou-se a C-63, resistindo a 1000 µg/ml de kanamicina e 500 µg/ml de ácido nalidixico. Os padrões de resistência natural a antibióticos para as 10 estirpes de *Rhizobium spp* frente aos 12 antibióticos ensaiados, praticamente não diferiram: tornar-se-ia difícil sugerir um mecanismo pelo qual as estirpes de *Rhizobium* pudessem tomar contacto continuamente com os antibióticos.

As estirpes de *R. phaseoli* se comportaram de forma semelhante, quanto aos níveis de resistência natural, àquela observada na literatura (Tabela 1). Para ampicilina não foram encontrados valores anteriores em literatura, indicando serem aqui obtidos pela primeira vez. Níveis mais altos foram obtidos para carbenicilina, vancomicina e polimixina, todos interferentes de membrana e parede celulares. Níveis iguais ou superiores a 100 µg/ml foram observados apenas para o ácido nalidixico e, mesmo assim, para algumas estirpes. Tal antibiótico é um quimioterápico que atua na síntese de ácidos nucleicos. Por outro lado, níveis menores ou iguais a 5 µg/ml foram obtidos para eritromicina, ampicilina, estreptomi-

cina, espectinomomicina, tetraciclina, neomicina e kanamicina. Entre estirpes, destacaram-se a C-29, a qual apresentou níveis de resistência mais elevados a 9 antibióticos (Em, Ap, St, Kn, Cc, Vc, Nc e Pc) e a C-88, resistindo a níveis mais elevados de Em, Ap e Vc. Nesse particular, há que se salientar que tais estirpes apresentaram bandas plasmidiais. As estirpes C-114, C-05, C-14 e C-105 sobressaíram-se por apresentar resistência a 200 µg/ml de ácido nalidixico. Os padrões de resistência natural foram semelhantes para a maioria das estirpes.

Entre grupos, as estirpes de *Rhizobium spp* apresentaram níveis mais altos que as estirpes de *R. phaseoli* (Figuras 2 e 3). Nesse particular, é verificado na literatura que estirpes de crescimento rápido foram mais susceptíveis a antibióticos, principalmente os produzidos por *Streptomyces* (GRAHAM, 1963b). Esse aspecto sofre especulações diversas por pesquisadores, principalmente em regiões tropicais, onde produção de antibióticos por Actinomicetos poderia constituir importante fator na origem e estabelecimento de estirpes tolerantes a níveis mais elevados de antibióticos como observado no Oeste da Austrália e solos de Cerrado do Brasil (GRAHAM, 1963b; SCOTTI *et alii*, 1981). Alguns autores sugerem, ainda, que o papel dos Actinomicetos (estreptomicina, neomicina, kanamicina, alguns dos antibióticos produzidos por *Streptomyces*) e outros antagonistas microbianos da rizosfera de leguminosas poderiam ser considerados não apenas em relação à competição e sobrevivência do *Rhizobium* mas, também, da alteração ao nível genético, da capacidade em estabelecer simbiose (KLECKOWSKA, 1964; VAN SCHREVEN, 1964).

Há que se considerar, também, que diferenças genéticas bási

cas entre os dois grupos de *Rhizobium* podem influenciar os padrões de resistência (PANKHURST, 1977). Assim, como verificado pelas Figuras 2 e 3, maior amplitude de variação para os níveis de resistência foi observado para as estirpes de *R. phaseoli*, onde a presença de estirpes fora do padrão de resistência da população foi, frequentemente, visível. O grupo de estirpes de *Rhizobium* spp ("cowpea") apresentou menor variação dos níveis de resistência, sendo que, para alguns antibióticos, as curvas apresentaram-se tipicamente bimodal, sugerindo a presença de uma população natural e outra mutante ou a presença de duas espécies diferentes dentro desse grupo. Tais informações podem encontrar aplicação na identificação de estirpes, pois, segundo JOSEY *et alii* (1979), os níveis naturais de resistência a antibióticos (resistência intrínseca) parecem ser propriedade estável da bactéria. Nesse particular, kanamicina e tetraciclina poderiam ser utilizadas em estudos ecológicos de *Rhizobium* spp, pois apresentaram níveis distintos e baixos. Por outro lado, vancomicina e tetraciclina poderiam diferenciar taxonomicamente os dois grupos de *Rhizobium* utilizados, pois apresentaram-se distintos e discrepantes.

Assim, a variabilidade existente dentro de espécies de *Rhizobium*, bem como do hospedeiro, pode ser atribuída à heterogeneidade genética dos fatores responsáveis pela simbiose (GIBSON, 1962); fixação de nitrogênio dentro dos nódulos resulta de uma interação, ou série de interações, envolvendo tecido da planta e células microbianas (FRANCIS e ALEXANDER, 1974). Dentro do aspecto bacteriano, a presença de diversos núcleos por célula e a complexa taxa de variações morfológicas apresentadas pelas espécies de *Rhizobium*, podem contribuir para resultados diversos (BALASSA, 1963).

5.3. Resistência a Metais e pH

Poucos foram os metais para os quais encontraram-se, em literatura, níveis naturais de resistência para *Rhizobium* spp e *R. phaseoli*. Assim, a comparação com a literatura (Tabela 5) é feita de forma especulativa, sendo que, em geral, os níveis encontrados no trabalho podem ser considerados dentro dos limites. Para a maioria dos metais, os níveis encontrados para as linhagens de *Rhizobium* spp foram semelhantes àqueles das estirpes de *R. phaseoli*, sendo que as primeiras apresentaram níveis mais altos para Cd e Zn, enquanto que as últimas, níveis superiores para Pb e Cu.

Em geral, não houve variações nos níveis dentro de linhagens de *Rhizobium* spp. Torna-se difícil estabelecer um critério de comparação devido à falta de literatura para a espécie; níveis superiores foram obtidos para ferro e inferiores para níquel e cromo. Níveis iguais ou superiores a 100 µg/ml foram obtidos para ferro e manganês. Tais elementos, antes que inibitórios, são necessários ao metabolismo, sendo suas concentrações mais elevadas no solo (Tabela 3). Por outro lado, uma variedade de cátions de metais pesados pode utilizar o sistema de transporte de cátions divalentes, assim como a maioria dos antimetabólitos (CHOPRA e HOWE, 1978). Níveis naturais menores ou iguais a 5 µg/ml foram obtidas para Al, Hg, Ni, Ag, Cu, Cd e Cr. Entre as estirpes, destacou-se a C-63, por ser sensível a Fe, Pb, Ni, Zn e Mn e mais resistente a cádmio.

Por outro lado, padrões semelhantes de resistência natural a metais foram obtidos para as estirpes de *R. phaseoli*; níveis marcadamente superiores obtiveram-se para ferro e chumbo e inferior para cromo. Níveis superiores ou iguais a 100 µg/ml foram obtidos para Fe, Pb e Mn e inferiores

ou iguais a 5 µg/ml para Al, Hg, Ni, Ag, Cd e Cr. Entre as estirpes, destacaram-se a C-29 por resistir a 200 µg/ml de Pb, 12,5 µg/ml de Cu, 10 µg/ml de Cd, 40 µg/ml de Zn e 7 µg/ml de Cr_2O_7^- e a C-14, resistindo a 200 µg/ml de Pb.

Entre os grupos, as estirpes de *Rhizobium spp* apresentaram níveis mais altos para Zn, enquanto as estirpes de *R. phaseoli* apresentaram níveis superiores para Pb (Tabela 18). A concentração de metais pesados no solo é relativamente baixa (Tabela 3), porém, o acúmulo em cadeias biológicas pode afetar a seleção de resistência microbiana. Isto pode resultar não apenas em uma perturbação da vida microbiana na natureza, bem como representar um grande perigo na transferência de resistência a metais e/ou antibióticos (MARQUES *et alii*, 1979). O efeito da resistência de *Rhizobium* a metais pesados sobre a associação simbiótica tem sido pouco estudada, mas observou-se aumento no tempo de geração bactéria, redução do número de nódulos e perdas da efetividade simbiótica (HOLDING e LOWE, 1971).

Através da Tabela 18, verifica-se que, com exceção do alumínio, mercúrio e manganês, não foram encontrados para os demais metais referências anteriores para níveis de resistência natural, sugerindo serem estes resultados obtidos pela primeira vez. Tais informações, tal como para os antibióticos, poderiam constituir características de distinção entre os grupos, principalmente, para Zn e Pb, para os quais foram observadas diferenças nítidas.

Com relação ao pH, tal como observado na literatura (Tabela 7), os níveis de tolerância foram, em geral, mais baixos para *Rhizobium spp*. Tal fato é consistente com a hipótese de que estirpes do grupo "cowpea" es-

tariam ligadas a solos mais ácidos (Tabela 6), o que, do ponto de vista ecológico, é bastante questionável (MUNNS, 1976; DATE, 1979; MUNNS *et alii*, 1979; NORRIS, 1965; BROCKWELL *et alii*, 1966). BROMFIELD e JONES (1980) discutem que em ambientes ácidos, pH 4,4, por exemplo, a bactéria poderia utilizar citrato, preferencialmente, como fonte de carbono.

A variação dentro das estirpes, em cada grupo, para tolerância a baixo pH, sugere a não existência de uma regra geral: não foram observadas correlações entre tolerância a pH e resistência a alumínio entre as estirpes de *R. phaseoli*. Para as estirpes de *Rhizobium spp*, observou-se que a C-63 não resistiu a pH mais baixo, apresentando níveis de resistência inferiores, também, para Al e Mn. O pH da rizosfera de determinadas plantas de solos ácidos pode apresentar pelo menos uma unidade a mais do que o solo que as contém (HOLDING e LOWE, 1971). DATE e HALLIDAY (1979) verificaram que o pH final do meio de cultura varia conforme a fonte de carbono disponível, não havendo correlação entre esse pH com o pH dos solos dos quais os *Rhizobium* foram isolados. Alguns dos ácidos produzidos por *Rhizobium* têm sido identificados, constituindo-se, principalmente, em ácido acético, isobutírico, butírico e pirúvico. Assim, se a produção de tais ácidos, observada em cultura pura, processar-se em seu microhabitat, haveria a possibilidade de modificação do pH e suas consequências ecológicas. Dentro desse contexto, o efeito de calagens na sobrevivência do *Rhizobium* no solo poderia ser atribuído quase que exclusivamente à elevação do pH do solo, uma vez que o *Rhizobium* tem um requerimento extremamente baixo por cálcio (BROMFIELD e JONES, 1980).

5.4. Isolamento de Mutantes Resistentes a Antibióticos e Curvas de Crescimento

O isolamento dos mutantes simples e duplos resistentes a espectinomomicina e estreptomicina se deu em concentrações altas dos antibióticos, confirmando o modelo de resistência monogênica ou de único passo, determinada por mutação no cromossomo principal (SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973). Tal mutação determina produção anormal de uma proteína específica na subunidade 30S do ribossomo (LEVIN e MONTGOMERY, 1974). JOHNSTON e BERINGER (1974) verificaram que a marca spc^+ foi transferida em alta frequência juntamente com a str^+ , entre espécies de *Rhizobium*, sugerindo que os genes para as referidas marcas devam estar proximamente ligados.

O tempo de geração da estirpe mutante duplo foi aproximadamente 40% maior que a selvagem, supondo uma maior lag fase para o mutante, tal como obtido por ALVES e AZEVEDO (1975) para resistentes à estreptomicina e por SCHWINGHAMER e DALMAS (1961) para o mutante resistente à eritromicina. Ao fim de 100 horas de cultivo, ambas as estirpes atingiram 10^7 células/ml, sugerindo que menores taxas de crescimento para os mutantes foram compensadas por período mais longo de fase logarítmica (ALVES e AZEVEDO, 1975). Os genes mutados conferindo resistência a tais aminoglicosídeos, parecem controlar uma importante função no metabolismo do *Rhizobium*, uma vez que suas taxas de crescimento foram diminuídas em relação ao selvagem (BERGAMIN FILHO *et alii*, 1973). Por outro lado, mutantes resistentes a estreptomicina, apresentando diferentes níveis de resistência dentro de uma mesma estirpe, apoiam a hipótese de que existem vários genes, com diferentes potenciais, determinando resistência a esse antibiótico (AZEVEDO e NEDER, 1963).

As frequências de mutantes simples resistentes a estreptomicina ou espectinomicina se deram a uma taxa natural de mutação tal como observado por PAIN (1979).

5.5. Avaliação da Infectividade e Efetividade de Estirpes Selvagem e Mutante de *Rhizobium* spp

Como observado pela Tabela 22, a infectividade bem como a efetividade (atividade da nitrogenase) foram reduzidas nos mutantes em relação ao selvagem. As baixas porcentagens de infectividade para as estirpes mutantes e os pesos de nódulos não correspondentemente tão baixos, sugerem que tais estirpes devam ter perdido em capacidade competitiva em relação às presentes no solo. Tais marcadores têm sido considerados para estudos ecológicos em *Rhizobium*. A obtenção dos mesmos ocorreu sob frequência natural de mutação (10^{-7}); a estreptomicina e a espectinomicina são aminoglicosídeos de largo espectro de ação antimicrobiana, os quais interferem com a função de uma proteína na subunidade 30S do ribossomo. Como observado no trabalho, alteração da efetividade simbiótica ligada a essas marcas tem sido frequentemente obtidas (SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973; SCHWINGHAMER e DALMAS, 1961; VISONA e PESCE, 1963; PANKHURST, 1977; ALVES e AZEVEDO, 1975; CASSINI, 1980), sendo referido que a resistência a inibidores de síntese proteica associa-se à perda variável da efetividade simbiótica. Se considerar-se que o gene que confere resistência a drogas não foi adicionado ao cromossomo do microorganismo e sim alterado de sua função original, é razoável supor-se que os mutantes resistentes apresentem, de alguma forma, o metabolismo alterado e, conseqüentemente, uma performance modificada (BERGAMIN FILHO *et alii*, 1975).

O largo espectro de mutações, os quais alteram a efetividade, sugere que a ação dos genes envolvidos no processo simbiótico pode ser modificada por mutação em loci, os quais não atuam diretamente no mesmo (SCHWINGHAMER, 1969). Deve-se reconhecer, entretanto, que os antimicrobianos podem ser meros indicadores de eventos mutacionais, os quais podem ter ocorrido espontaneamente antes da exposição das células dos agentes seletivos: inefetividade ligada a esses mutantes pode ser expressão pleiotrópica de mutação simples (SCHWINGHAMER, 1964). Assim, a complexa interação entre efetividade e mutação para resistência não tem determinado fenotipicamente uma correlação definida entre tal associação. Provavelmente, as principais implicações dos efeitos desses marcadores na simbiose refiram-se à base bioquímica ou fisiológica do papel desempenhado pelas células do *Rhizobium* em nodulação efetiva (SCHWINGHAMER, 1964).

Várias hipóteses, parcialmente válidas, têm sido discutidas com relação à associação eficiência simbiótica - resistência a drogas em *Rhizobium* (ALVES, 1975; CASSINI, 1980; SCHWINGHAMER, 1964, 1969; MAIER e BRILL, 1976). Porém, a diversidade de resultados obtidos sobre a resistência em *Rhizobium* e os resultados obtidos no trabalho, dificulta sugerir-se qualquer generalização.

5.6. Perfis de DNA Extracromossômico das Estirpes de *Rhizobium* Utilizadas

A presença de bandas de DNA extracromossômico (plasmídeos) foi observada para três estirpes de *Rhizobium* spp e quatro estirpes de *R. phaseoli*, sendo que duas das últimas apresentaram mais de uma banda. Os

pesos moleculares foram, em geral, maiores que 90 Mdaltons, tal como observado em literatura. Nesse particular, MEYERS *et alii* (1976) salientam que eletroforese em gel de agarose pode ser utilizada para determinar pesos moleculares de plasmídios com menos de 10% de erro, sendo que HANSEN e OLSEN (1978) verificaram linearidade de migração, em géis, de grandes plasmídios com, aproximadamente, 140 Mdaltons. Nenhuma característica fenotípica foi comprovadamente associada à presença dos plasmídios.

As estirpes C-114 e C-29 apresentaram mais de uma banda plasmidial. Tal fato, poderia ter alguma implicação, pois, sendo estirpes frequentemente utilizadas em inoculação de feijoeiro, são introduzidas e resritas a áreas de cultivo intensivo, possibilitando-lhes maior contato com agentes seletivos e/ou com outros organismos passíveis de transferência de material genético inter e intra-específicos.

A base genética do processo de nodulação e especificidade hospedeira é pouco conhecida, mas sugerem-se que pelo menos 5 regiões do grupo "nif" devam estar envolvidas na síntese e regulação do sistema fixador de N_2 . Evidências genéticas indicam que alguns genes da bactéria ligados ao processo simbiótico estariam localizados em plasmídios (DUNICAN e CANNON, 1971; BECHET e GUILLAUME, 1978; ZURKOWSKI e LORKIEWCZ, 1979; BEYNON *et alii*, 1980). Contrariamente, algumas estirpes utilizadas não apresentaram bandas plasmidiais, porém, possuíam atividade simbiótica (Tabelas 13 e 14). Tais estirpes, para as quais não foram detectadas bandas plasmidiais, não foram, geneticamente, determinadas como isogênicas e, considerando ainda, que perda de plasmídios não é fato incomum, dificulta inferir-se sobre o envolvimento de plasmídios na nodulação.

A estirpe C-29, tal como verificado por CASSINI (1980), apresentou produção de bacteriocina; tem sido observado que características tais como produção de bacteriocinas e resistência a antibióticos podem estar ligadas a plasmídios (JOHNSTON *et alii*, 1978; HARDY, 1975; KOWALCZUK e LORKIEWCZ, 1977; HIRSCH, 1979).

6. CONCLUSÕES

(1) Embora os padrões de resistência natural a drogas, metais pesados e pH ácido apresentassem pequena variação entre estirpes de uma mesma espécie, tais padrões servem como auxiliares na caracterização de *R. phaseoli* e *Rhizobium* spp, uma vez que os mesmos podem diferir entre esas espécies, sendo mais elevados para *Rhizobium* spp.

(2) Níveis mais elevados de resistência natural a antibióticos foram observados, em ambas as espécies, para drogas interferentes da síntese e permeabilidade da membrana e parede celulares.

(3) As estirpes mutantes de *Rhizobium* spp resistentes a antibióticos empregadas, mostraram considerável diminuição da infectividade e efetividade simbiótica em *Vigna unguiculata* em relação à selvagem correspondente, provavelmente devido à perda da capacidade competitiva para nodulação.

(4) Capacidade simbiótica nem sempre correlacionou-se com presença de bandas de DNA extracromossômico para as estirpes utilizadas.

7. LITERATURA CITADA

- ALAM, S.M., 1981. Influence of aluminium on plant growth and mineral nutrition of barley. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 12: 121-138.
- ALEXANDER, M. e A.J. FRANCIS, 1974. Physiological comparison of effective and ineffective strains of two *Rhizobium* species. *Soil Science*, 118: 31-37.
- ALLEN, E.K. e O.N. ALLEN, 1950. Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bacteriological Reviews*, 14: 273-330.
- ALVES, M.F., 1975. Mutantes de *Rhizobium japonicum* (KIRCHNER) BUCHANAN, resistentes a estreptomicina e sua infecciosidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 81 p. (Dissertação de Mestrado).
- ALVES, M.F. e J.L. AZEVEDO, 1975. Isolamento e características de mutantes de *Rhizobium japonicum* resistentes a estreptomicina. *Summa Phytopathologica*, 1: 206-212.
- AZEVEDO, J.L.; S.T.A. CASSINI e A. OLIVEIRA, 1980. Replicador multi-alça

para uso geral em bacteriologia (submetido à publicação em *Summa Phytopathologica*.

AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de *Xanthomonas campestris* (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de Pammel Dowson. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 20: 160-173.

BALASSA, G., 1963. Genetic transformation of *Rhizobium*: a review of the work of R. Balassa. *Bacteriological Reviews*, 27: 228-241.

BARBER, L.E., 1980. Enumeration, effectiveness and pH resistance of *Rhizobium meliloti* populations in Oregon soils. *Soil Science Society American Journal*, 44: 537-539.

BARRETO, W.O.; M.A.M. DURIEZ e R.A.L. JOHAS, 1979. Análises químicas. Manual de métodos de análises de solo - Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo. EMBRAPA, Rio de Janeiro.

BECHET, M. e J.B. GUILLAUME, 1978. Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology*, 24: 960-966.

BERGAMIN FILHO, A.; H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*, 1: 31-42.

BERGERSEN, F.J.; A.H. BROCKWELL; A.H. GIBSON e E.A. SCHWINGHAMER, 1971.

Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*, Special Volume: 3-16.

BERINGER, J.E., 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal*

General Microbiology, 84: 188-198.

BERINGER, J.E.; J.L. BEYNON; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON e A.W.B. JOHNSTON, 1978.

Transfer of the drug-resistance trasposon Tn 5 to *Rhizobium*. *Nature*, London, 276: 633-634.

BEYNON, J.L.; J.E. BERINGER e A.W.B. JOHNSTON, 1980. Plasmids and host-range

in *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium phaseoli*. *Journal General Microbiology*, 120: 421-429.

BOUTON, J.H.; M.E. SUMNER e J.E. GIDDENS, 1981. Alfalfa, *Medicago sativa* L.

in highly weathered, acid soil. II. Yeld and acetylene reduction of a plant germplasm and *Rhizobium meliloti* inoculum selected for tolerance to acid soil. *Plant and Soil*, 60: 205-211.

BRILL, W.J., 1979. Nitrogen fixation: basic to applied. *American Scientist*, 67: 458-466.

BROCKWELL, J.; S.K. ASVO e G.A. REA, 1966. Acid production by *Rhizobium*

from the genera *Trifolium* and *Lotus*. *Journal Australian Institute of Agricultural Science*, 32: 295-297.

BROCKWELL, J.E.; E.A. SCHWINGHAMER e R.R. GAULT, 1977. Ecological studies

of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biological Biochemistry*, 9: 19-24.

BROMFIELD, E.S.P. e D.G. JONES, 1980. Studies on acid tolerance of *Rhizobium*

trifolii in culture and soil. *Journal Applied Bacteriology*, 48: 253-264.

- BROUGHTON, W.J., 1978. Control of specificity in legume *Rhizobium* associations. *Journal Applied Bacteriology*, 45: 165-194.
- BURRIS, R.H., 1974. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. *Plant Physiology*, 54: 443-449.
- CALDWELL, B.E. e VEST, G., 1970. Effects of *Rhizobium japonicum* strains on soybean yields. *Crop Science*, 10: 19-21.
- CALDWELL, B.C. e D.F. WEBER, 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates. *Agronomy Journal*, 62: 12-14.
- CASSE, F.; C. BOUCHER; J.S. JULLIOT; M. MICHEL e J. DÉNAIRE, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal General Microbiology*, 113: 229-242.
- CASSINI, S.T.A., 1980. Atividade bacteriocinogênica e capacidade competitiva entre estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Piracicaba, ESALQ/USP, 113 p. (Dissertação de Mestrado).
- CHARTONE-SOUZA, 1975. Resistência a drogas e propriedades colicínogênicas em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, UFMG, 79 p. (Dissertação de Mestrado).
- CHOPRA, I. e T.G.B. HOWE, 1978. Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiology Reviews*, 42: 707-724.
- CLARK, D.L.; A.A. WEIS e S. SILVER, 1977. Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *Journal Bacteriology*, 132: 186-196.

- CLOONAN, M.J., 1963. Black nodules in *Dolichos*. *Australian Journal Science*, 26: 121.
- DAMIRGI, S.M.; L.R. FREDERICK e I.C. ANDERSON, 1967. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. *Agronomy Journal*, 59: 10-12.
- DATE, R.A. e J. HALLIDAY, 1979. Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. *Nature*, London, 277: 62-64.
- DAUM, S.J. e J.R. LEMKE, 1979. Mutational biosynthesis of antibiotics. *Annual Reviews Microbiology*, 33: 241-265.
- DAVIES, J. e D.I. SMITH, 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annual Reviews Microbiology*, 32: 469-518.
- DAVIS, R.J., 1962. Resistance of Rhizobia to antimicrobial agents. *Journal Bacteriology*, 84: 187-188.
- DE-POLLI; H.; A.A. FRANCO e J. DOBEREINER, 1973. Sobrevivência de *Rhizobium* em solos de baixada sujeitos à inundação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Série Agron., 18: 133-138.
- DEVINE, T.E.; C.D. FOY; A.L. FLEMING; C.H. HANSON; T.A. CAMPBELL; J.E. McCURTREY II e J.W. SCHWARTZ, 1976. Development of alfalfa strains with differential tolerance to aluminum toxicity. *Plant and Soil*, 44: 73-79.
- DILWORTH, M.J. e C.A. PARKER, 1969. Development of the nitrogen-fixing systems in legumes. *Journal Theoretical Biology*, 25: 208-218.
- DIXON, R.A. e J.R. POSTGATE, 1971. Transfer of nitrogen fixation genes by

conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, London, 234: 4708.

DIXON, R.A. e J.R. POSTGATE, 1972. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*, London, 237: 102-103.

DÖBEREINER, J., 1965. Black nodules in *Centrosema pubescens*. *Soil Biology International News Bulletin* 2.

DÖBEREINER, J., 1966. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans in acid soils. *Plant and Soil*, 24: 153-166.

DÖBEREINER, J.; R.H. BURRIS e A. HOLLAENDER, 1978. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. Plenum Press, New York and London. 398 p.

DRAPEAU, R.; J.A. FORTIN e C. GAGNON, 1973. Antifungal activity of *Rhizobium*. *Canadian Journal Botany*, 51: 681-682.

DUNICAN, L.K. e F.C. CANNON, 1971. The genetic control of properties symbiotic in *Rhizobium*: evidence for plasmid control. *Plant and Soil*, special volume: 73-79.

DUNICAN, L.K. e A.B. TIERNEY, 1974. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*. *Biochemistry Biophysical Research Communality*, 57: 62-72.

ELLIS, N.J.; G.G. KALZ e J.J. DONCASTER, 1962. Transformation in *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal Microbiology*, 8: 835-840.

FRANÇA, G.E.; A.F.C. BAHIA FILHO e M.M. CARVALHO, 1973. Influência de

magnésio, micronutrientes e calagem no desenvolvimento e fixação simbiótica de nitrogênio na soja perene var. tinaroo (*Glycine wightii*) em solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Série Agron., 8: 197-202.

FRED, E.B. e S.A. WAKSMAN, 1932. Laboratory manual of general microbiology. Mc-Graw Hill Book Co., New York.

GEORGI, C.E. e J.M. ETTINGER, 1941. Utilization of carbohydrates and sugar acids by the rhizobia. *Journal Bacteriology*, 41: 323-340.

GIBSON, A.H., 1962. Genetic variation in the effectiveness of lucerne varieties. *Australian Journal of Agriculture Research*, 13: 388-399.

GRAHAM, P.H., 1963a. Vitamin requirements of root nodule bacteria. *Journal General Microbiology*, 30: 245-248.

GRAHAM, P.H., 1963b. Antibiotic sensitivities of root nodule bacteria. *Australian Journal Biological Science*, 16: 557-559.

GRAHAM, P.H., 1980. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Field Crops*, 3 (in press).

GRAHAM, P.H., 1981. Agronomic practises affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ecology of nitrogen fixation. V. 3, W.J. Broughton (in press).

GRAHAM, P.H. e D.H. HUBBELL, 1974. Legume-*Rhizobium* relationships in tropical agriculture. *Florida Agriculture Experimental Station Journal*, series nº 5439.

- GRAHAM, P.H. e C.A. PARKER, 1964. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil*, 20: 383-396.
- GRAHAM, P.H.; S.E. VITERI; F. MACKIE; A.T. VARGAS e A. PALACIOS, 1981. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research* (in press).
- GRESSHOFF, P.M.; M.L. SKOTNICKI e B.G. ROLFE, 1979. Crown gall teratoma formation in plasmid and plant controlled. *Journal Bacteriology*, 137: 1020-1021.
- GROSS, D.C.; A.K. VIDAVER e R.V. KLUCAS, 1979. Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. *Journal General Microbiology*, 114: 257-266.
- HAGEDORN, C., 1979. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. *Soil Science Society American Journal*, 43: 921-925.
- HANSEN, J.B. e R.H. OLSEN, 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *Journal Bacteriology*, 135: 227-238.
- HARDY, K.G., 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriological Reviews*, 39: 464-515.
- HEUMANN, W., 1968. Conjugation in star-forming *Rhizobium lupini*. *Molecular General Genetics*, 102: 132-144.

- HIGASHI, S., 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *Journal General Applied Microbiology*, 13: 391-403.
- HIRCH, P.R., 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal General Microbiology*, 113: 219-228.
- HOLDING, A.J. e J.F. LOWE, 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium*-leguminous association. *Plant and Soil*, Special Volume: 153-166.
- HOLL, F.B., 1975. Host plant control of the inheritance of di-nitrogen fixation in the *Pisum*-*Rhizobium* symbiosis. *Euphytica*, 24: 767-770
- HOYT, P.B. e M. NYBORG, 1971a. Toxid metals in acid soil. I. Estimation of plant-available Aluminium. *Soil Science Society American Proceedings*, 35: 236-240.
- HOYT, P.B. e M. NYBORG, 1971b. Toxid metals in acid soil. II. Estimation of plant-available Manganese. *Soil Science Society American Proceedings*, 35: 241-244.
- JOHNSON, H.W.; V.M. MEANS e C.R. WEBER, 1965. Competition for nodule sites, between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal*, 157: 179-185.
- JOHNSTON, A.W.B. e J.E. BERINGER, 1977. Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. *Nature*, London, 267: 611-613.
- JOHNSTON, A.W.B.; J.L. BEYNON; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON; S.M. SETCHELL; P.R. HIRSCH e J.E. BERINGER, 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, London, 276: 634-636.
- JORDAN, D.C.; Y. YAMAMURA e M.E. McKAGUE, 1966. Mode of action of viomycin

- on *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology*, 13: 1005-1012.
- JOSEY, D.P.; J.L. BEYNON; A.W.B. JOHNSTON e J.E. BERINGER, 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *Journal Applied Bacteriology*, 46: 343-350.
- KECSKE'S, S.M. e E. MANNINGER, 1962. Effect of antibiotic on the growth of the rhizobia. *Canadian Journal Microbiology*, 8: 157-159.
- KELCH, W.J. e J.S. LEE, 1978. Antibiotic resistance patterns of Gram negative bacteria isolated from environmental sources. *Applied Environmental Microbiology*, 36: 450-456.
- KEYSER, H.H. e D.N. MUNNS, 1979. Effects of Calcium, Manganese and Aluminium on growth of rhizobia in acid media. *Soil Science Society American Journal*, 43: 500-503.
- KEYSER, H.H.; D.N. MUNNS e J.S. HOHENBERG, 1979. Acid tolerance of rhizobia in culture and symbiosis with cowpea. *Soil Science Society American Journal*, 43: 719-722.
- KHAZAEI, M.B. e R.S. MITRA, 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 46-50.
- KLECZKOWSKA, J., 1964. Mutations in symbiotic effectiveness in *Rhizobium trifolii* caused by transforming DNA and other agents. *Journal General Microbiology*, 40: 377-383.
- KOWALCZUK, E. e Z. LORKIEWICZ, 1977. Transfer of Rldrd 19 plasmid from

Escherichia coli J53 to *Rhizobium trifolii* by conjugation. *Acta Microbiology Polonica*, 26: 9-18.

KOWALSKI, M., 1971. Transduction in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, Special Volume: 63-66.

KOWALSKI, M. e J. DÉNAIRE, 1972. Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez *Rhizobium meliloti*. *C. R. Academic Science*, Paris, 275: 141-144.

KOWALSKI, M.; G.E. HAM; L.R. FREDERICK e I.C. ANDERSON, 1974. Relationship between strains of *Rhizobium japonicum* and their bacteriophages from soil and nodules field-grown soybeans. *Soil Science*, 118: 221-228.

LACAZ, C.S., 1969. *Antibióticos*. Editora da Universidade de São Paulo. 2a. edição, São Paulo. 610 p.

LANGE, N.A., 1961. Handbook of chemistry text edition of LANGE. Tenth Edition, McGraw Hill Book Company. New York. 1969 p.

LEMOES, M.V.F., 1980. Estudos genéticos no microorganismo fixador de nitrogênio *Azospirillum brasiliensis* (KRIEG e TARRAND, 1977). Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina/USP, 70 p. (Tese de Doutorado).

LEVIN, R.A. e M.P. MONTGOMERY, 1974. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, 41: 669-676.

LOPES, E.S.; L.A.C. LOVADINI; S. MIYASAKA; T. IGUE e A.R. GIARDINI, 1974. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp para amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e galaxia (*Galactia striata* (JACQ) URBAN). *Bragantia*, 33: CV-CX.

- MAC NEIL, D.; T. MAC NEIL e W.J. BRILL, 1978. Genetic modifications of N_2 -fixing systems. *Biological Science*, 28: 576-579.
- MAIER, R.J. e W.J. BRILL, 1976. Ineffective and non-nodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*. *Journal Bacteriology*, 127: 763-769.
- MARQUES, A.M.; F. CONGREGADO e D.M. SIMON-PUJOL, 1979. Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *Journal Applied Bacteriology*, 47: 347-350.
- MARTINEZ-DE DRETS, G. e A. ARIAS, 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* in to fast-and-slow growing groups. *Journal Bacteriology*, 109: 467-470.
- McKNIGHT, 1949. Efficiency of isolate of *Rhizobium* in the cowpea group with propionate addition to the group. *Qd. Journal Agriculture*, 6: 61-76.
- MEYERS, J.A.; D. SANCHEZ; L.P. ELWELL e S. FALKOW, 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal Bacteriology*, 127: 1529-1537.
- MORTVEDT, J.J.; P.M. GIORDANO e W.L. LINDSAY, 1972. Micronutrients in agriculture. *Soil Science Society American, Inc.* Madison, Wisconsin, USA. 666 p.
- MUNNS, D.N., 1976. Mineral nutrition and the legume simbyosis. p. 353-392. In: R.W.F. HARDY and A.N. GIBSON (eds.), *Treatise on dinitrogen fixation*. Section IV, Wiley, New York.
- MUNNS, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture I. Acid sensitive steps. *Plant and Soil*, 28: 129-146.

- MUNNS, D.N. e H.H. KEYSER, 1981. Response of *Rhizobium* strains to acid and Aluminium stress. *Soil Biological Biochemistry*, 13: 115-118.
- MUNNS, D.N.; H.H. KEYSER; V.W. FLOGLE; J.S. HOHEMBERG; T.L. RIGHET; D.L. LAUTER; M.G. ZAROUG; K.L. CLARKIN e K.W. WHITACRE, 1979. Tolerance of soil acidity in symbiosis of mung bean with rhizobia. *Agronomy Journal*, 71: 256-260.
- MUNNS, D.N., 1970. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and requirements during infection. *Plant and Soil*, 32: 90-102.
- MURRMANN, R.P.; R.W. WINTERS e T.G. MARTIN, 1971. Determination of trace elements in soils and clay minerals by resonance neutron activation analysis. *Soil Science Society American Proceedings*, 35: 647-652.
- NAKAHARA, H.; T. ISHIKAWA; Y. SARAI; I. KONDO; H. KUZUKE e S. SILVER, 1977. Linkage of Mercury, Cadmium and Arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 33: 975-976.
- NORRIS, D.O., 1965. Acid production by *Rhizobium*: a unifying concept. *Plant and Soil*, 22: 247-270.
- NUTMAN, P.S., 1946. Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and in the "effectivity" of the symbiosis. *Journal Bacteriology*, 51: 411-432.
- NUTI, M.P.; A.M. LEDEBOER; A.A. LEPIDI e R.A. SCHILPEROORT, 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. *Journal General Microbiology*, 100: 241-248.

- OLIVEIRA, F.M., 1980. Transferência e expressão de plasmídios R em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, UFMG, 64 p. (Dissertação de Mestrado).
- OMAE, S., 1979. Poluição do solo por metais pesados de resíduos industriais. Seminário apresentado no CPG do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.
- PAIN, A.N., 1979. Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal Applied Bacteriology*, 47: 53-64.
- PANKHURST, C.E., 1977. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast-and-slow growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Canadian Journal Microbiology*, 23: 1026-1033.
- PATTISON, A.C. e F.A. SKINNER, 1974. The effects of antimicrobial substances on *Rhizobium* spp and their use on selective media. *Journal Applied Bacteriology*, 37: 239-250.
- PELCZAR JR., M.J.; R.D. REID e E.C.S. CHAN, 1977. *Microbiology*. 4a. edição, Mc-Graw Hill Book Company, USA. 952 p.
- PEREIRA, R.M.F.V., 1979. Efeito do nitrogênio mineral e calagem do solo sobre a fixação do nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 78 p. (Dissertação de Mestrado).
- PHILLIPS, D.A.; R.L. HOWARD e H.J. EVANS, 1973. Studies on the genetic control of a nitrogenase component in leguminous root nodules. *Physiology Plant*, 28: 248-253.

- PICKETT, A.W. e A.C.R. DEAN, 1979. Cadmium and Zinc sensitivity and tolerance in *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and in a *Pseudomonas* sp. *Microbios*, 24: 51-64.
- PINTO, C.M.; Y.Y. PUAIK e J.M. VINCENT, 1974. Noduling competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii*. *Australian Journal Agriculture Research*, 25: 317-329.
- POSTGATE, J.R., 1977. Possibilities for the enhancement of biological nitrogen fixation. *Phil. Trns. R. Soc. Lond. B.*, 281: 249-260.
- RAINA, J.L. e V.V. MODI, 1972. Deoxyribonucleate binding and transformation in *Rhizobium japonicum*. *Journal Bacteriology*, 111: 356-360.
- RAKOTOARISOA, R.R.; R. TAILLIEZ e J.B. GUILLAUME, 1981. Obtention d'un mutant de *Rhizobium meliloti* adapté aux cultures de Luzerne en terres acides. *Plant and Soil*, 60: 99-110.
- SAITO, S.M.T.; S.T.A. CASSINI e A.P. RUSCHEL, 1980. Determinação da eficiência de estirpes de *R. phaseoli* usando características culturais e em simbiose com *Phaseolus vulgaris* L. Trabalho apresentado na X RELAR; Setembro de 1980, Maracay, Venezuela.
- SANCHES, P.A., 1976. Properties and management of soil in the tropics. John Wiley and Sons, New York. 618 p.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1964. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Canadian Journal Microbiology*, 10: 221-233.

- SCHWINGHAMER, E.A., 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 33: 121-136.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1968. Loss of effectiveness and infectivity in mutants of *Rhizobium* resistant to metabolic inhibitors. *Canadian Journal Microbiology*, 14: 355-367.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1969. Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in *Rhizobium leguminosarum* and *R. trifolii*. *Canadian Journal Microbiology*, 15: 611-622.
- SCHWINGHAMER, E.A. e R.L. DALMAS, 1961. Studies on induced variation in the rhizobia. II. Radiation sensitivity and induction of antibiotic-resistance markers. *Journal Applied Microbiology*, 9: 410-414.
- SCHWINGHAMER, E.A. e W.F. DUDMAN, 1973. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *Journal Applied Bacteriology*, 36: 263-272.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; N.M.H. SÁ; M.A.P. VARGAS e J. DÖBEREINER, 1981. Spontaneous streptomycin resistant of *Rhizobium* strains isolated from Brazilian Cerrados and competition advantages. (enviado para publicação).
- SIK, T. e L. OROSZ, 1971. Chemistry and genetics of *Rhizobium meliloti* phage 16-3. *Plant and Soil*, Special Volume: 57-62.
- SKOTNICKI, M.L. e B.G. ROLFE, 1978. Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both *Rhizobium* and Agrobacterium. *Journal Bacteriology*, 133: 518-526.

- STAMFORD, N.P., 1978. Efeito de estirpes de *Rhizobium* sp, do nitrogênio, do fósforo e enxofre na avaliação da fixação do N₂, crescimento e absorção de nutrientes em cultivares de *Vigna unguiculata* (L) WALP. Piracicaba, ESALQ/USP, 151 p. (Tese de Doutorado).
- STRANDBERG, G.W.; S.Z. SHUMATE II e J.R. PARROTT JR., 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 237-245.
- SUMMERS, A.O.; G.A. JACOBY; M.N. SWARTZ; G. McHUGH e L. SUTTON, 1978. Metal cation and oxyanion resistances in plasmids of gram-negative bacteria. *Microbiology*: 128-131.
- SUMMERS, A.O. e S. SILVER, 1978. Microbial transformations of metals. *Annual Reviews Microbiology*, 32: 637-672.
- TRINICK, J.J., 1969. Identification of legume nodule bacterioids by the fluorescent antibody reaction. *Journal Applied Bacteriology*, 32: 181-186.
- TRINICK, M.J., 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp, *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *Journal Applied Bacteriology*, 49: 39-53.
- UPCHURCH, R.G. e G.H. ELKAN, 1977. Comparison of colony morphology, salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal Microbiology*, 23: 1118-1122.

- VAN SCHREVEN, D.A., 1964. The effect of some Actinomycetes in rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. *Plant and Soil*, 21: 283-302.
- VAN LAREBEKE, N.; G. ENGLER; M. HOLSTERS; S. VAN DEN ELSACKER; I. ZAENEN; R.A. SCHILPEROORT e J. SCHELL, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing ability. *Nature*, London, 252: 169-170.
- VESPER, S.L., 1978. Effects of Cadmium, Nickel, Cooper and Zinc on nitrogen fixation by soybeans. *Water, Air & Soil Pollution*, 9: 413-422.
- VINCENT, J.M., 1962. Influence on Ca e Mg on growth of *Rhizobium*. *Journal General Microbiology*, 28: 653-663.
- VINCENT, J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook, p. 73-104, n° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- VINCENT, J.M., 1977. *Rhizobium: General microbiology*. In a treatise on dinitrogen fixation, Section III: Biology, p. 277-366. Edited by R.W. F. Hardy and W.S. Silver. New York, John Wiley.
- VISONA, L. e E. PESCE, 1963. Action de quelques antibiotiques sur la symbiose du trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.). *Annales de L'Institut Pasteur*, 105: 368-382.
- ZURKOWSKI, W. e Z. LORKIEWICZ, 1976. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Rhizobium trifolii*. *Journal Bacteriology*, 128: 481-484.
- ZURKOWSKI, W. e Z. LORKIEWICZ, 1979. Plasmid-mediated control of nodulation

in *Rhizobium trifolii*. *Arch. Microbiology*, 113: 195-201.

WATSON, B.; T.C. CURRIER; M.P. GORDON; M.D. CHILTON e E.W. NESTER, 1975.

Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 123: 255-264.

WELSCH, R.M., 1981. The biological significance of nickel. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 345-356.

YADOV, N.R. e S.R. YVAS, 1972. Note of response of root nodule rhizobia to saline, alkaline and acid conditions. *Indian Journal of Agricultural Science*, 41: 1123-1125.