SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*
TOLERANTES A FATORES DE ACIDEZ E RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN

BIOLOGA

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Solos e Nutrição
de Plantas

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Denardin, Norimar D'Avila

D391s Seleção de estirpes de Rhizobium leguminosarum
bv. phaseoli tolerantes a fatores de acidez e re-
sistentes a antibióticos. Piracicaba, 1991.
89p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio - Resistên-
cia ao antibiótico 2. - Nodulação 3. Nitro-
gênio - Fixação 4. Solo - Acidez I. Es-
cola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 633.9

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*
TOLERANTES A FATORES DE ACIDEZ E RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN

Aprovada em: 05/03/1981.

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas	CENA/USP
Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso	ESALQ/USP
Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho	ESALQ/USP

Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Orientador

Ao meu esposo

José

Aos meus filhos

Graziela

Larissa

Matheus

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas pela orientação, apoio e amizade.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas facilidades proporcionadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos funcionários da Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) Siu Mul Tsai, Marli de Fátima Flore, Roberto Bonetti, Francisco C. Montrazzi, Mário Bizetto e em especial a Márcio A. Gava e a estagiária Valéria C. Franco.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo e a Dra. Beatriz Mendes pela amizade.

A todos os professores e funcionários da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico.....	3
2.2. Tolerância do <i>Rhizobium</i> a pH baixo.....	9
2.3. Tolerância do <i>Rhizobium</i> a níveis tóxicos de alumínio.....	15
2.4. Resistência do <i>Rhizobium</i> a antibióticos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Coleta das amostras de solo.....	23
3.2. Análises químicas das amostras de solo.....	24
3.3. Isolamento de rizóbios a partir de nódulos obtidos em <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
3.4. Teste de infectividade e eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico de isolados de <i>Rhizobium</i> em <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
3.5. Tolerância de isolados de <i>Rhizobium</i> a pH 4,5 e a pH 4,5 + 100 µM de alumínio.....	30
3.6. Resistência de isolados de <i>Rhizobium</i> a	

antibióticos.....	31
3.7. Avaliação da habilidade de isolados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> em infectar raízes de <i>Leucaena leucocephala</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Características da acidez dos solos utilizados para isolamento de estirpes de <i>Rhizobium</i>	35
4.2. Características morfológicas das colônias de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> isoladas.....	37
4.3. Capacidade infectiva e eficiência de fixação de nitrogênio atmosférico de isolados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> em <i>Phaseolus vulgaris</i>	42
4.4. Tolerância de isolados de <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> a pH baixo e à toxidez de alumínio.....	50
4.5. Resistência de isolados de <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> a antibióticos.....	59
4.6. Habilidade de estirpes de <i>Rhizobium leguminosarum</i> , isoladas de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , em infectar raízes de <i>Leucaena leucocephala</i> ...	70
5. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES	87

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*
TOLERANTES A FATORES DE ACIDEZ E RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Autora: Norimar D'Ávila Denardin

Orientador: Álvaro Augusto Teixeira Vargas

RESUMO

De 31 amostras de solo, coletadas em regiões de cultivo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), no estado de São Paulo, foram obtidos 151 isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Esses rhizóbios, isolados a partir de nódulos radiculares em plantas de feijoeiro, foram purificados, autenticados, descritos morfológicamente e submetidos a uma seleção quanto a eficiência simbiótica, tolerância a fatores de acidez, pH 4,5 e pH 4,5 + 100 µM, de alumínio, e resistência a antibióticos. Parte desses isolados foram testados para inoculação cruzada em plantas de *Leucaena leucocephala*, objetivando-se avaliar a habilidade infectiva e a eficiência simbiótica nesta leguminosa. Os isolados

apresentaram elevada variabilidade comportamental quanto a eficiência simbiótica, tolerância à acidez e resistência aos 7 níveis dos 7 antibióticos estudados. Os resultados permitiram destacar estirpes com atividades da nitrogenase superiores às da testemunha CM 02 (CIAT 899), tolerância aos fatores de acidez e resistência aos antibióticos. De 140 isolados testados para infectar e fixar nitrogênio em *Leucaena leucocephala*, 106 formaram nódulos, sendo que 99 destes apresentaram eficiência simbiótica e 57 toleraram aos fatores de acidez.

SELECTION OF STRAINS OF *Rhizobium leguminosarum*
bv. *phaseoli* TOLERANT TO ACIDITY FACTORS
AND RESISTANT TO ANTIBIOTICS

Autora: Norimar D'Ávila Denardin

Orientador: Álvaro Augusto Teixeira Vargas

SUMMARY

From 31 soil samples used, 151 strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* were isolated. These strains were isolated from nodules obtained from common bean (*Phaseolus vulgaris*) plant, purified, identified, morphologically described and selected for efficiency in N₂ fixation, tolerance to acidity factors (pH 4.5 and pH 4.5 + 100 μ M Al) and resistance to antibiotics. To evaluate cross-inoculation ability strains were inoculated in *Leucaena leucocephala* plants. The isolates showed high variability in symbiotic efficiency for N₂-fixation, tolerance to soil acidity factors and resistance to antibiotics studied. Strains with nitrogenase activity

higher than the control, tolerant to acidity factors and resistant to antibiotic were selected. From 140 isolates tested for infection and nitrogen fixation in *Leucaena leucocephala* plant 106 nodulated, and from these 99 showed symbiotic effectiveness and 57 tolerance to acidity factors.

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) é cultivado no Brasil, basicamente, por pequenos produtores, como cultura de subsistência, sem o emprego de insumos potencialmente, promotores de uma elevada produtividade. O rendimento médio, obtido sob tal sistema de produção, está limitado a 500 kg/ha, contrastando com produtividades superiores a 3.000 kg/ha de áreas experimentais, ou de áreas sob o emprego de técnicas apropriadas. As deficiências nutricionais nessa cultura, principalmente aquelas ocasionadas pelo nitrogênio, são comuns em, praticamente, todas as regiões produtoras do País.

Uma das alternativas para aumentar a produtividade do feijoeiro, em condições de deficiência de nitrogênio, sem elevar, significativamente, os custos de produção, é fazer uso da prática de inoculação de sementes com estirpes de *Rhizobium* específicas. Contudo, para esta técnica resultar em benefícios é necessário uma adequada simbiose entre o feijoeiro e o *Rhizobium*.

Sob condições ambientais adequadas, o nitrogênio atmosférico fixado, por meio dessa simbiose, pode atender a maior parte das necessidades do feijoeiro, para com este elemento. Entretanto, os fatores da acidez do solo, pH baixo e concentrações elevadas de alumínio tóxico, frequentemente, limitam todas as etapas do processo de infecção das raízes, formação de nódulos e assimilação de nitrogênio na planta.

Partindo da hipótese de que no solo existem estirpes de *Rhizobium* com características diversificadas quanto ao comportamento frente à tolerância a fatores de acidez, sensibilidade a antibióticos, capacidade infectiva e eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico, este estudo tem por objetivos:

- isolar, purificar, autenticar, selecionar e conservar estirpes de *Rhizobium* com potencialidade para infectar e fixar nitrogênio atmosférico, em plantas de feijoeiro, tolerar a fatores de acidez e resistir a antibióticos;

- selecionar estirpes de *Rhizobium leguminosarum* com potencialidade para infectar e fixar nitrogênio em plantas de *Leucaena leucocephala*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico

Questões relacionadas a ecologia do *Rhizobium*, tais como, habilidade colonizadora e competição de estirpes por sítios de infecção nodular, necessitam melhores conhecimentos.

O aumento da eficiência da simbiose, entre o *Rhizobium* e a planta hospedeira, somente será obtido a partir do momento em que estirpes eficientes tornarem-se viáveis à inoculação.

O processo simbiótico é estabelecido quando a bactéria infecta e nodula o hospedeiro. Contudo, o estabelecimento de uma simbiose eficiente depende de propriedades intrínsecas dos simblontes, bem como, da ação exercida pelos fatores ambientais, sejam, separadamente, ou por meio de interações entre estes fatores (VINCENT, 1980).

As estirpes de *Rhizobium* apresentam grande

variabilidade quanto a habilidade em infectar e nodular a planta hospedeira (NUTMAN, 1967). Frequentemente, estirpes ineficientes produzem mais nódulos por planta hospedeira do que estirpes eficientes, em função da fisiologia nodular que apresentam (DART, 1974). FRENEY & GIBSON (1974) sugerem que as propriedades intrínsecas às estirpes podem diferenciá-las quanto a capacidade de retenção e transporte de nitrogênio fixado.

Estirpes de rizóbios que nodulam e fixam nitrogênio, eficientemente, quando associadas a algumas espécies, ou cultivares de plantas hospedeiras, podem apresentar baixa eficiência de fixação quando associadas a outras (FRANCO & DOBEREINER, 1967; LOPES et alii, 1978a). Desse modo, a eficiência das estirpes, quando considerada isoladamente, não levando-se em conta o hospedeiro, tem pouca validade (VINCENT, 1974).

Em trabalho conduzido por LOPES et alii (1978b), para testar a eficiência simbiótica de 19 estirpes de *Rhizobium phaseoli*, em 4 cultivares de feijoeiro, foi observado que 13 destas estirpes mostraram-se eficientes nas cultivares Carlota e Piratã, 4 na cultivar Moruna e 5 na cultivar Golano-Precoce. As estirpes SMS 371 e SMS 376 foram, igualmente, eficientes nessas 4 cultivares, sendo que a estirpe SMS 377 nodulou, mas não foi eficiente na fixação de nitrogênio nas cultivares testadas.

VARGAS et alii (1983) encontraram, em locais de cultivo de feijoeiro, abundante nodulação natural, muito embora fossem nítidos os sintomas de deficiência de nitrogênio. A população nativa de *Rhizobium*, já estabelecida no solo, representa, segundo WEAVER & FREDERICK, (1974), ROUGHLEY et alii, (1976), GRAHAM, (1981), MOAWAD & BOHLOOL, (1984), a maior limitação para o sucesso da inoculação com novas estirpes, oriundas de outros locais. VARGAS & GRAHAM (1988) selecionaram 20 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* de um total de 225 estirpes estudadas para a tolerância à acidez do solo e eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio. Embora os resultados no campo, em quatro regiões do Brasil, com algumas dessas estirpes, tenham apresentado ganhos substanciais na produção de grãos de feijão, em pelo menos 25 % desses experimentos não houve nenhum benefício com a inoculação. A causa mais provável para esse insucesso, uma vez que os experimentos foram conduzidos em solos deficientes em nitrogênio mineral, foi a dificuldade no estabelecimento das estirpes introduzidas e a competição por sítios de infecção nodular.

A inoculação do feijoeiro com seu *Rhizobium* homólogo foi, durante muito tempo, considerada uma prática agrícola de resultado incerto. PESSANHA et alii (1972) citam que na literatura há exemplos de correlações

negativas entre o número de nódulos formados pelo *Rhizobium* e a produção de grãos. Entretanto, resultados recentes mostram que o tratamento das sementes com esses microorganismos melhora, sensivelmente, o desenvolvimento das plantas, podendo aumentar o rendimento de grãos (GRAHAM & HALLIDAY, 1977; GRAHAM & ROSAS, 1977; RUSCHEL & SAITO, 1977; RUSCHEL et alii, 1982; VARGAS et alii, 1983; DUQUE et alii, 1985; VARGAS & GRAHAM, 1989). Com essa variabilidade de comportamento, torna-se necessário que as estirpes componentes de um inoculante apresentem alta eficiência com o maior número possível de cultivares, para proporcionar à estas, sob condições nutricionais e fisiológicas favoráveis, a maximização da fixação simbiótica de N_2 .

A colonização da rizosfera com populações de *Rhizobium* pode ser influenciada por excreções e exudatos radiculares, cuja composição varia em aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares (ROVIRA, 1969; VINCENT, 1977; BROUGHTON, 1978). Essas substâncias podem atuar, seletivamente, na população de *Rhizobium* através da capacidade de metabolização desses compostos pelas estirpes. PUEPPKE et alii (1978) citam em inúmeros trabalhos o mecanismo de atração quimiotática na infecção de leguminosas pelo *Rhizobium* específico, atribuindo este fenômeno às glicoproteínas (lectinas) que são encontradas em sementes e na superfície das raízes e dos pêlos

radiculares desta família de plantas. Segundo BOHLOOL & SCHMIDT (1974), WOLPERT & ALBERSHEIM, (1976) e DAZZO (1982) este reconhecimento entre o *Rhizobium* específico e a leguminosa hospedeira se dá através de ligações com polissacarídeos presentes na superfície da bactéria.

Efeitos de diversos fatores ambientais sobre a nodulação e a fixação de nitrogênio têm sido observados. A tolerância à acidez, apresentada pelo hospedeiro e pelas estirpes de *Rhizobium*, tem permitido generalizações sobre o comportamento de leguminosas em solos ácidos (MUNNS, 1978). O efeito da acidez do solo na nodulação e na eficiência simbiótica está relacionado, principalmente, ao pH, à toxidez de alumínio e de manganês (DOBEREINER, 1966) e à baixa disponibilidade de nutrientes essenciais à simbiose, como cálcio, fósforo e molibdênio (NORRIS & DATE, 1976).

O processo de infecção das raízes de leguminosas pelos rizóbios consiste de várias etapas que precedem a formação de nódulos. Essas etapas consistem do reconhecimento entre os rizóbios e a planta hospedeira (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974; BOHLOOL & SCHMIDT, 1976; SCHMIDT, 1979; BHUVANESWARI & BAUER, 1978; DAZZO & HUBBELL, 1975), adsorção dos rizóbios à superfície das raízes do hospedeiro (SCHMIDT, 1979; BAUER, 1981; DAZZO et alii, 1976; DAZZO et alii, 1984), curvamento dos pêlos radiculares pelos

exudatos dos rizóbios (BAUER, 1981; BHUVANESWARI & SOLHEIM, 1985; YOA & VINCENT, 1969; HUBBELL, 1970) e a formação do cordão infectivo (BAUER, 1981; BHUVANESWARI & SOLHEIM, 1985; CALLAHAM & TORREY, 1981). Todas essas etapas são importantes para o sucesso da nodulação. Qualquer fator, biológico ou ambiental, que afete alguma dessas etapas, poderá comprometer a etapa subsequente, prejudicando a eficiência desse processo simbiótico.

Observações realizadas por BHUVANESWARI et alii (1980) na cultura da soja, constataram que os pêlos radiculares capazes de serem infectados pelos rizóbios, no momento da inoculação, estão localizados na faixa acima do ponto de alongamento da raiz e abaixo do ponto de emergência do pêlo radicular mais jovem. VARGAS & GRAHAM (1989) encontraram no feijoeiro uma situação semelhante a da soja quanto a distribuição dos nódulos, embora existam variações entre a distribuição de nódulos entre estirpes e cultivares. Assim, caso exista alguma limitação na multiplicação dos rizóbios, na rizosfera da planta, a nodulação induzida pelo inoculante não terá muito sucesso, uma vez que o período, em que os pêlos radiculares permanecem susceptíveis à infecção é muito curto.

Aumentando-se a dosagem de inoculante aplicado às sementes das leguminosas pode, algumas vezes, melhorar a nodulação, tanto pela sobrevivência da estirpe

inoculada na rizosfera da planta, quanto pelo fato de uma população mais alta favorecer a competição dos rizóbios pelos sítios de infecção nodular (BOHLOOL & SCHMIDT, 1973; VARGAS & GRAHAM, 1989). JOHNSON & MEANS (1964), aumentando em 25 vezes a dose de inoculante normalmente utilizada por produtores de soja, encontraram um aumento médio de 5 vezes no percentual de nódulos formados por algumas estirpes estudadas. Contudo, esse aumento na dosagem de inoculante não tem validade prática num sistema de produção agrícola, pois gastos adicionais com inoculantes, além dos custos operacionais, tornaria essa alternativa inviável.

Estirpes de *Rhizobium* recomendadas para inoculantes de leguminosas, além de serem eficientes para a fixação simbiótica do nitrogênio, devem ser competitivas e capazes de persistir no solo mesmo na ausência da planta hospedeira.

2.2. Tolerância do *Rhizobium* a pH baixo

Uma prática para aumentar a produtividade do feijoeiro, em condições de deficiência de nitrogênio, é melhorar a simbiose entre esta planta e o *Rhizobium*. Em ambientes favoráveis, a fixação do nitrogênio atmosférico, através de simbiose, pode suprir a maior parte das necessidades deste elemento para o desenvolvimento da

planta. Entretanto, fatores como a acidez do solo, frequentemente, limitam a simbiose, afetando todas as etapas do processo de infecção das raízes pelo *Rhizobium* e inibindo a formação de nódulos. A seleção de estirpes de *Rhizobium* tolerantes à acidez, como uma técnica alternativa para superar as limitações do suprimento de nitrogênio ao feijoeiro em solos ácidos, tem sido realizada com sucesso, melhorando o desenvolvimento de inoculantes.

Os danos da acidez no crescimento e sobrevivência do *Rhizobium* no solo podem, algumas vezes, ser solucionados através do aumento da dosagem do inoculante (ROBSON & LONERAGAN, 1970; MUNNS, 1977b; MUNNS, 1977a; RICE & OLSEN, 1983). Entretanto, a magnitude das dosagens requeridas para o sucesso dessas inoculações não é prático para uso comum por parte de agricultores. Por outro lado, tem se dado ênfase à seleção de estirpes de *Rhizobium* tolerantes à acidez do solo. Estirpes de *Rhizobium* tolerantes à acidez, selecionadas em meio de cultura, geralmente, têm apresentado boas respostas, quando inoculadas em solos ácidos, colonizando o solo e infectando as plantas hospedeiras, em níveis superiores aqueles de estirpes consideradas sensíveis à acidez (KEYSER & MUNNS, 1979; GRAHAM et alii, 1982; THORNTON & DAVEY, 1983b).

Rizóbios são microorganismos neutrofilicos que crescem numa faixa de pH entre 4,0 e 9,5 (GRAHAM &

PARKER, 1964), muito embora, a maioria das estirpes tenha um pH ótimo em torno de 7,0 (GRAHAM & PARKER, 1964; BROMFIELD & JONES, 1980). DATE & HALLIDAY (1979) citam duas estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de solos ácidos, incapazes de crescer em meio de cultura com pH neutro. Resultados similares foram encontrados por SOUZA et alii, (1984), demonstrando que a maioria dos rizóbios isolados de leguminosas florestais nativas, em solos ácidos da Amazônia, foram capazes de crescer em meio de cultura com agar a pH 5,0, mas poucos isolados puderam crescer em meio com pH 7,0. Alguns isolados de *Bradyrhizobium* são citados, por VINCENT, (1985), como tolerantes a pH 3,5. Contudo, em experimentos onde o pH do meio de cultura foi verificado após a autoclavagem e a inoculação foi feita com baixo número de células, observou-se uma pequena percentagem dos isolados testados tolerantes a pH 4,5 (KEYSER & MUNNS, 1979; GRAHAM et alii, 1982; VARGAS & GRAHAM, 1988).

Considera-se que, normalmente, dentro das Rhizobiaceas o *Bradyrhizobium* de crescimento lento, é mais tolerante à acidez do que o *Rhizobium* de crescimento rápido (GRAHAM & PARKER, 1964; VINCENT, 1985; MUNNS, 1978). Estirpes de *Bradyrhizobium*, normalmente, produzem alcali em meio de cultura, uma característica, originalmente, interpretada como uma resposta evolucionária para a vida em regiões tropicais de solos ácidos (NORRIS, 1985).

Entretanto, tem sido demonstrado que mudanças de pH em meio de cultura, dependem da fonte de carbono e da quantidade disponível de tampão com fósforo (SKOTNICKI & ROLFE, 1977; ZABLOTOWICZ & FOCHT, 1981).

HERNANDES & FOCHT (1984), estudando 103 estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* do grupo caupi, encontraram que a taxa de crescimento e as mudanças de pH em meio de cultura não estão relacionadas, e que a caracterização dos rizóbios do grupo caupi, como sendo do grupo de crescimento lento e produtores de alcali, é um conceito inválido.

Dentro de cada espécie de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* existe uma grande variação para a tolerância ao pH baixo (KEYSER & MUNNS, 1979; GRAHAM et alii, 1982; VARGAS & GRAHAM, 1988; WOOD & COOPER, 1985). As diferenças entre estirpes de *Rhizobium* para a tolerância a acidez em meio de cultura líquido, poderá se tornar difícil devido ao metabolismo do substrato pelas bactérias, que podem provocar modificações do pH do meio. Assim, o consumo de açúcar, ou açúcar-álcool, resulta, geralmente, na acidificação do meio, enquanto que a utilização de aminoácidos, como fonte de energia, provoca um aumento da alcalinidade (HOWIESON, 1985).

Os rizóbios variam, grandemente, nos requerimentos nutricionais para seu crescimento, mesmo

entre diferentes estirpes da mesma espécie (BERGERSEN, 1981; GRAHAM & PARKER, 1984; HERNANDES & FOCHT, 1984). GRAHAM et alii (1982) introduziram um método simples mas rigoroso, onde a tolerância dos rizóbios à acidez é baseada na formação de colônias isoladas em meio contendo agar acidificado para pH 4,5. GUNNINGHAN & MUNNS (1984), utilizando este método, observaram que apenas 5, de 55 isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, cresceram nesse meio, e que algumas destas estirpes, foram capazes de crescer numa faixa de pH em torno de 4,0. Muitas substâncias tampões têm sido utilizadas durante o crescimento dos rizóbios para manter o pH constante, porém, limitações são observadas (BROMFIELD & JONES, 1980).

Estudos sobre o regulamento do pH em citoplasma de *Rhizobium*, mais precisamente sobre pH externo elevado e sua relação com a fixação de nitrogênio, têm recebido, recentemente, grande atenção (BHANDARI & NICHOLAS, 1985; GOBER & KASHKET, 1986), porém tem-se dado pouca importância para este mecanismo na sobrevivência dos rizóbios em ambientes ácidos.

Trabalhos, com células vegetativas de *Rhizobium meliloti* mostraram um pH citoplasmático ao redor de 8,5 a diversos valores de pH externos em uma faixa de pH oscilando de 5,0 a 9,0, enquanto que os bacteróides não apresentaram nenhuma evidência de controle homeostático

(TREMBLAY & MILLER, 1984). Esse comportamento talvez seja um dos fatores responsável pela baixa viabilidade dos bacteróides após serem isolados dos nódulos (SUTTON & PATTERSON, 1983; YANZHEN & JUNCHU, 1984).

CUNNINGHAM & MUNNS (1984) encontraram uma correlação positiva entre a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e a tolerância à acidez no *Rhizobium* de feijoeiro. O efeito do EPS do *Rhizobium* no aumento à tolerância não foi provocado pelo tamponamento do pH, ou diminuição do efeito tóxico do alumínio, mas pelo aumento da disponibilidade de fosfato (CUNNINGHAM & MUNNS, 1985), sendo uma importante preocupação para os solos ácidos, onde a deficiência de fósforo também é um problema.

O movimento do *Rhizobium* na direção de componentes químicos (quimiotaxia) é citado em vários trabalhos (BOWRA & DILWORTH, 1981; GOTZ et alii, 1982). Rizóbios isolados de ervilha mostraram motilidade dependente do pH do meio (EL-HALOUJ et alii, 1988) com um efeito quimiotático na faixa de pH 7,0 a 7,5. A diminuição da motilidade em pH baixo pode ser importante, desde que a quimiotaxia possa influenciar a competição do *Rhizobium* por sítios de infecção nodular nas raízes de leguminosas.

2.3. Tolerância do *Rhizobium* a níveis tóxicos de alumínio

A toxidez do alumínio tem sido associada com a redução da produtividade das culturas. A combinação de concentrações baixas de fósforo, baixo pH e teores elevados de alumínio caracterizam condições de estresse para as plantas.

A tolerância dos microorganismos aos metais pesados é determinada pela toxidez ao DNA e outros constituintes celulares (KARLIK et alii, 1980). De acordo com MISRA et alii (1983) a tolerância dos microorganismos aos metais pesados é determinada por DNA não cromossômico (plasmídeo).

Ainda é desconhecido o mecanismo de tolerância ao alumínio. Para *Rhizobium*, a tolerância ao pH baixo e ao alumínio são características estáveis (MUNNS & KEYSER, 1981), provavelmente, reguladas pelo DNA cromossômico.

O alumínio causa múltiplos efeitos sobre as células procarióticas e eucarióticas, podendo interagir com o DNA (SIROVER & LOEB, 1978; KARLIK et alii, 1980), inibindo a atividade de enzimas, como a hexoquinase e a gliceroquinase em leveduras (VIOLA et alii, 1980) e diminuindo a permeabilidade da membrana lipídica do

Thermoplasma acidophilum (VIERSTRA & HAUG, 1978).

Em *Anabaena cylindrica*, o alumínio absorvido interage com a membrana celular e induz uma deficiência de fósforo (PETTERSSON et alii, 1985a; PETTERSSON et alii, 1985b; PETTERSSON et alii, 1986).

Efeitos do alumínio no crescimento dos rizóbios em cultura pura, nas concentrações entre 4,0 uM e 100 uM, têm sido demonstrado por diferentes autores (KEYSER & MUNNS, 1979; GRAHAM et alii, 1982; THORNTON & DAVEY, 1983a; WOOD & COOPER, 1984; VARGAS & GRAHAM, 1988; AYANABA et alii, 1983).

MUNNS & KEYSER (1981) observaram que a frequência de divisão celular foi reduzida pelo alumínio, e concluíram que os rizóbios, em fase de multiplicação, mostram evidências de alta sensibilidade para o alumínio e íons hidrogênio. A associação de íons alumínio e hidrogênio afetam a sobrevivência dos rizóbios em solos ácidos, que possuem altas concentrações de alumínio trocável (GRAHAM et alii, 1982; LOWENDORF & ALEXANDER, 1983; THORNTON & DAVEY, 1983a).

HOLDING & KING (1983) citam que a infectividade da população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* no solo foi, negativamente, correlacionada com o decréscimo de bases nesses solos. VAN SCHREVEN (1972) encontrou um decréscimo na infectividade de

algumas estirpes de *Rhizobium trifolii* após um longo período de sub-cultura em meio ácido.

2.4. Resistência do *Rhizobium* a antibióticos

Estirpes de *Rhizobium* recomendadas para a inoculação de leguminosas, além de serem eficientes na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico, devem ser competitivas e capazes de persistir no solo, mesmo na ausência da planta hospedeira.

A utilização de estirpes de *Rhizobium* selecionadas para resistência a antibióticos poderia contribuir para o sucesso do estabelecimento desses rizóbios no solo. Embora existam trabalhos que citam a ausência de efeito antagonista de microorganismos do solo, sobre *Rhizobium* (DAMIRGI & JOHNSON, 1966; KOSSLAK & BOHLOOL, 1985), é comum encontrar uma flora microbiana no solo, principalmente de actinomicetos, que ao excretar substâncias antibióticas, podem afetar os rizóbios. SCOTTI et alii (1982) mencionaram que o fracasso da inoculação de soja e *Stylosanthes* com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium* sp., respectivamente, estava relacionado com a tolerância destas estirpes a antibióticos. Esses autores citam, também que estirpes

capazes de se estabelecer e produzir nódulos chegaram a ser tolerantes a níveis de 180 ppm para alguns antibióticos testados.

A ação dos antibióticos sobre a célula bacteriana pode estar relacionada com a interferência na estrutura da parede celular, ou na membrana celular, ou ainda com a inibição do processo metabólico interno.

Estudos ecológicos de longa duração, em espécies de *Rhizobium*, sob condições de campo, depende da estabilidade dos marcadores usados para distinguir uma estirpe da outra. A técnica de resistência a antibióticos tem sido empregada com bons resultados. Entretanto, pode ocorrer, em condições de campo, alguma perda das características imunológicas e de resistência a antibióticos. Em 95 % dos casos de identificação de estirpes seleccionadas para resistência à estreptomicina *in vitro*, não têm esse mesmo comportamento no campo. O uso de outros marcadores permitiria resolver questões relativas a outras características de identificação (BROCKWELL et alii, 1977).

A resistência de 48 estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* a vários antibióticos, largamente utilizados, foi estudada por COLE & ELKAN (1979) empregando discos de papel impregnados com antibióticos. A resistência das estirpes a cloranfenicol, polimixina B e

eritromicina chegou a 60 %, enquanto que 47 % das estirpes, ou mais, foram resistentes a neomicina e penicilina G.

SCOTTI et alii (1982), visando estabelecer fatores bióticos que poderiam estar interferindo na nodulação de soja e *Stylosanthes* em solos de cerrado, avaliaram a tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium* sp. de *Stylosanthes*, aos antibióticos kanamicina e cloranfenicol. Esses autores observaram que a maioria das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* toleraram níveis de 20, 40 e 300 ug/ml de kanamicina, tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente.

HAGEDORN (1979) estudou 50 isolados de *Rhizobium trifolii*, divididos em 5 categorias de infectividade simbiótica, examinando-os quanto a resistência a 15 antibióticos. A redução da infectividade ocorreu em 12 % dos isolados resistentes e o aumento da infectividade em apenas 3 sub-culturas (2,5 %), ocorrendo aleatoriamente, entre as 5 categorias de infectividade.

A resistência a qualquer antibiótico induz alterações em um, ou mais genes e estas alterações poderiam resultar em mudanças de algumas características genéticas que poderiam, ou não, incluir a infectividade (HAGEDORN, 1979). A perda da infectividade seria mais uma função particular de mutação do que propriamente uma classe de resistência associada a qualquer antibiótico e,

apesar de existirem muitos antibióticos que poderiam ser usados para selecionar estirpes de rizóbios tolerantes, há aqueles que podem prejudicar características essenciais como a eficiência simbiótica.

Observações feitas por LEVIN & MONTGOMERY (1974) mostraram que não houve a perda da infectividade e nem da eficiência simbiótica em mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* resistentes a viomicina. Os autores sugerem que a relação entre infectividade simbiótica e resposta a antibiótico não é geral entre rizóbios, e que as funções inibidas por viomicina e outros antibióticos poderiam não estar relacionadas com a simbiose entre *Rhizobium* e a leguminosa, ou com a eficiência simbiótica.

TURCO et alii (1986) testaram 30 isolados de *Rhizobium leguminosarum* e 3 isolados de *Bradyrhizobium japonicum*, duplamente resistentes a antibióticos, para eficiência na fixação de nitrogênio molecular e para a competitividade. Desses isolados, 93 % foram menos competitivos na formação de nódulos. Entretanto, somente 38 % dos rizóbios isolados reduziram a eficiência de fixação do nitrogênio atmosférico.

JOSEY et alii (1979), trabalhando com estirpes de *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium leguminosarum*, observaram que o padrão de resistência a antibióticos permaneceu estável tanto em sub-cultivos como em

reisolamentos de nódulos.

A resistência à estreptomicina, tem sido a mais usada para experimentos genéticos porque mutantes resistentes são facilmente isolados e permanecem estáveis em cultivo ou em passagem por plantas (SCHWINGHAMER, 1977).

COLE & ELKAN (1979) observaram que a resistência aos antibióticos penicilina e estreptomicina são características variáveis, ao contrário da resistência à neomicina, cloranfenicol e polimixina B.

Isolando variantes de *Bradyrhizobium japonicum*, diferentes na morfologia, MEYER & PUEPPKE (1980), verificaram que as variantes que formavam colônias grandes eram as mais sensíveis aos antibióticos testados, enquanto que as que formavam colônias pequenas eram mais tolerantes. MACLAUGHLIN & AHMAD (1984) observaram uma correlação entre a morfologia da colônia de estirpes de *Rhizobium* do caupi e altos níveis de resistência intrínseca a antibióticos. As estirpes resistentes mostraram uma morfologia colonial gomosa e crescimento lento enquanto o contrário não foi verdadeiro.

SINCLAIR & EAGLESHAM (1984), estudando a resistência a 5 antibióticos, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, penicilina G e rifampicina, verificaram, em 128 culturas de *Rhizobium* isolados de caupi, que entre as culturas resistentes a no mínimo três antibióticos, 87 %

formaram colônias translúcidas, aquosas, confluentes e achatadas, e 89 % das culturas resistentes a dois antibióticos, ou menos, formaram colônias opacas e pastosas. Entretanto, a diversidade de informações existentes para resistência a antibióticos em *Rhizobium* parece não admitir generalizações (HAGERDON, 1979).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos neste estudo, o trabalho de pesquisa foi subdividido em etapas, abrangendo atividades a nível de campo, casa de vegetação e laboratório.

A exceção da etapa referente à coleta de amostras de solo, desenvolvida em lavouras de feijoeiro no estado de São Paulo, todas as demais foram realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

3.1. Coleta das amostras de solo

As amostras de solo, destinadas ao trabalho de isolamento de rizóbios, foram coletadas em 31 lavouras de feijoeiro do estado de São Paulo. As amostras, compostas de 10 subamostras por lavoura, foram coletadas na camada de 0 a 10 cm de profundidade, junto à rizosfera do feijoeiro aproximadamente um mês após a semeadura.

Uma fração de cada amostra foi submetida à análises químicas e o restante utilizada para o cultivo do feijoeiro com a finalidade de isolar nódulos de rizóbios.

Os locais de amostragem estão apresentados na Tabela 1.

3.2. Análises químicas das amostras de solo

Os solos foram submetidos as análises de pH em água, na proporção de 2:1, de hidrogênio e de alumínio, seguindo as técnicas descritas por RAIJ et alii (1987) e VETTORI (1969). Os resultados dessas análises encontram-se expostas na Tabela 1.

3.3. Isolamento de rizóbios a partir de nódulos obtidos em *Phaseolus vulgaris*

Em copos plásticos, previamente, desinfestados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10 %, durante 30 minutos, colocou-se, aproximadamente, 500 g de cada uma das 31 amostras de solo, com a finalidade de cultivar-se *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) e obter-se nódulos para o isolamento de colônias de *Rhizobium*.

Em cada vaso foram semeadas 4 sementes de feijão, da variedade Carlocá, as quais foram desinfestadas,

superficialmente, com álcool 98⁰ GL, durante 5 minutos, e a seguir imersas em uma solução de bicloreto de mercúrio 0,02 %, acidificada com ácido clorídrico (VINCENT, 1970), durante 3 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas por 6 vezes sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada.

Quatro dias após a emergência das plântulas realizou-se um desbaste, deixando-se apenas 2 plântulas por vaso.

Os vasos foram irrigados com água comum de torneira por um período de 35 dias.

Aos 35 dias após a semeadura os nódulos foram coletados das plantas e acondicionados em pequenas embalagens de vidro, as quais foram fechadas, etiquetadas e conservadas em freezer a -10⁰ C até o isolamento dos rizóbios.

Cinco nódulos de cada vaso, tomados ao acaso, foram desinfestados, superficialmente, com álcool 98⁰ GL, durante 5 minutos, e a seguir imersos na solução de bicloreto de mercúrio (VINCENT, 1970), durante 3 minutos, e lavados por seis vezes sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada. A seguir, os nódulos foram colocados em placas de petri esterilizadas, masserados um de cada vez, com o auxílio de um bastão de vidro, o qual, após cada masseração, foi lavado com álcool 98⁰ GL,

flambado e, ligeiramente, resfriado. Cada nódulo masserado foi transferido para uma placa de petri esterilizada, contendo o meio de cultura extrato levedura e manitol - YM (VINCENT, 1970), adicionado de 10 ml/l da solução indicadora vermelho congo na concentração de 2,5 g/l de água. Após 5 dias de incubação as colônias, características de *Rhizobium*, foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio YM inclinado.

3.4. Teste de infectividade e eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico de isolados de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris*

Isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, obtidos por meio de replicagem do material armazenado no meio YM inclinado, foram desprendidas das placas de petri com uma solução salina esterilizada de cloreto de sódio a 0,4 %. A seguir transferiu-se 1 ml dessa suspensão para um frasco erlenmeyer contendo 25 ml do meio YM líquido, incubando-se à temperatura ambiente e sob agitação constante, durante 4 dias, até a obtenção de uma concentração aproximada de 10^9 rizóbios/ml de meio. Os inoculantes, assim produzidos, foram usados em plântulas de feijoeiro, para avaliar a capacidade infectiva dos isolados, bem como, a eficiência destes na fixação do

nitrogênio atmosférico.

O teste de infectividade foi desenvolvido em casa de vegetação utilizando-se o sistema de vasos Leonard modificado (VINCENT, 1970). Os vasos foram encapados com papel pardo e preenchidos com vermiculita e sílica, na proporção de 2:1, respectivamente. A esterilização dos vasos foi realizada adicionando-se aos mesmos água destilada e deionizada, autoclavando-se este conjunto durante 4 horas a 125°C sob uma pressão de 1,5 atm.

Em cada vaso foram semeadas 4 sementes de feijão da variedade Carloca, as quais foram desinfestadas superficialmente com álcool 98°GL , durante 5 minutos, e a seguir imersas em uma solução de bicloreto de mercúrio 0,02 %, acidificada com ácido clorídrico (VINCENT, 1970), durante 3 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas 6 vezes sucessivas com água destilada deionizada e esterilizada.

Quatro dias após a emergência das plântulas realizou-se um desbaste, deixando-se apenas 2 plântulas por vaso. A seguir procedeu-se a inoculação das mesmas com o inoculante elaborado. A inoculação foi realizada com 1 ml de inoculante por plântula. Dois vasos foram conduzidos como testemunhas, não recebendo inoculação.

Os vasos foram irrigados com solução

nutritiva de Mc Knight, descrita no Apêndice 1, alternando-se com água destilada, deionizada e esterilizada, por um período de 35 dias.

Após os 35 dias de cultivo foi realizada uma avaliação visual do desenvolvimento das plantas, coloração da parte aérea, número de nódulos, tamanho de nódulos e coloração da parte interna dos nódulos.

O experimento foi conduzido sem repetições, obtendo-se 151 estirpes de *Rhizobium* dos 155 isolados testados.

Todos os 151 isolados que se mostraram infectivos foram conservados em tubos de ensaio contendo o meio YM inclinado, em tubos de ensaio contendo o meio YM vertical com óleo mineral e em ampolas liofilizadas, sendo estocados no banco de germoplasma de *Rhizobium* do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

O experimento, para a avaliação da eficiência na fixação do nitrogênio atmosférico, foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se o sistema de vasos Leonard modificado (VINCENT, 1970), como descrito no experimento anterior.

Em cada vaso foram semeadas 4 sementes de feijão da variedade Carioca, as quais foram desinfestadas superficialmente com álcool 98^o GL, durante 5 minutos, e a seguir imersas na solução de bicloreto de mercúrio 0,02 %,

acidificada com ácido clorídrico (VINCENT, 1970), durante 5 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas 6 vezes sucessivas com água destilada deionizada e esterilizada.

Quatro dias após a emergência das plântulas realizou-se um desbaste, deixando-se apenas 2 plântulas por vaso. A seguir procedeu-se a inoculação das plântulas com o inoculante elaborado, utilizando-se 1 ml do mesmo por plântula.

Os vasos foram irrigados com solução nutritiva de Mc Knight, descrita no Apêndice 1, alternando-se com água destilada, deionizada e esterilizada, por um período de 40 dias.

O experimento foi conduzido com as 151 estirpes de *Rhizobium* obtidas no experimento anterior, e com a estirpe CM 02 (CIAT 899) como testemunha, sem repetições, aplicando-se a técnica de seleção massal. Essa estirpe de *Rhizobium* é recomendada para inoculação de feijoeiro no Brasil (RELARE, 1988).

Para avaliar a atividade da enzima nitrogenase, a qual é determinada pela sua capacidade de reduzir o acetileno, foram utilizadas raízes noduladas do feijoeiro, colocando-se as mesmas em frascos com capacidade para 500 ml hermeticamente fechados com tampas apropriadas. A seguir, extraiu-se 50 ml de ar do interior

de cada frasco e, imediatamente, injetou-se, para o interior dos mesmos, 50 ml de acetileno, deixando-se incubar por 30 minutos. Após esse período retirou-se de cada frasco 0,5 ml de ar com seringas tipo "Alergo", injetando-se esta alíquota no cromatógrafo de gás (Beckman GC-85).

Após a leitura, as raízes foram retiradas dos frascos, lavadas e extraídos os nódulos para contagem e pesagem dos mesmos. As raízes, bem como, a parte aérea, foram secas, até peso constante, em estufa, a 40^o C, com circulação de ar e avaliada a massa de matéria seca.

3.5. Tolerância de isolados de *Rhizobium* a pH 4,5 e a pH 4,5 + 100 µM de alumínio

Para avaliar a tolerância dos rizóbios a pH 4,5 e a pH 4,5 + 100 µM de alumínio foi empregado o método descrito por GRAHAM et alii (1982), utilizando-se o meio agar de Keyser-Munns modificado por GRAHAM et alii (1982). O meio de cultura, após ser esterilizado por autoclavagem, foi ajustado para pH 4,5, utilizando-se ácido clorídrico, ou hidróxido de sódio, esterilizados por filtração através de filtro "Millipore" (0,45 micras), para o teste de tolerância a pH 4,5, e adicionado de 100 µM de $AlK(SO_4)_2.12H_2O$, também, previamente, esterilizado por

filtragem através de filtro "Millipore" (0,45 micras), para o teste de tolerância a pH 4,5 + 100 uM de alumínio. Os meios de cultura foram vertidos em placas de petri esterilizadas, replicando-se, a seguir, as 151 estirpes de *Rhizobium* e colocando-se estes conjuntos em incubação na câmara de crescimento a 28⁰ C, durante 4 dias. Foram considerados como tolerantes aquelas estirpes capazes de formar colônias isoladas nesses meios sob essas condições.

3.6. Resistência de isolados de *Rhizobium* a antibióticos

Determinou-se a sensibilidade das 151 estirpes de *Rhizobium* a 7 antibióticos diferentes, sendo eles estreptomicina (INLAB), rifampicina (LEPTIT-MERRELL), cloranfenicol (FRUMTOST S.A.), espectinomicina (UPJOHN), tetraciclina (FLURA AG), neomicina (SIGMA) e kazugamicina (SIGMA), nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 ug/ml, tendo como testemunha o nível zero de antibiótico.

As diluições dos antibióticos foram realizadas com diferentes substâncias, em função de suas necessidades, ou seja: cloranfenicol e kazugamicina diluídos em etanol a 90 %; espectinomicina, sulfato de neomicina, tetraciclina e sulfato de estreptomicina diluídos em água; e rifampicina diluído em metanol a 95 %.

As soluções estoque de antibióticos foram esterilizadas por filtração através de filtro "Millipore" (0,45 micras).

Discos de papel filtro (Whatman nº 1), medindo, 0,5 cm de diâmetro, umedecidos com água destilada e deionizada, foram colocados em placas de petri, esterilizados em autoclave, por 40 minutos, e secos em estufa. A seguir, os discos de papel foram impregnados com as diferentes concentrações dos diversos antibióticos. Para a impregnação os discos de papel foram imersos, por um período de 72 horas, em um erlenmeyer contendo 50 ml de cada uma das soluções dos antibióticos. Após esse período, os discos de papel, impregnados de antibiótico, foram colocados em placas de petri esterilizadas, secos na câmara de fluxo laminar e, posteriormente, conservados sob refrigeração.

O meio utilizado para o teste dos antibióticos foi o YM que após autoclavado, foi mantido em banho-maria a 52⁰ C para que permanecesse no estado líquido até o momento de ser vertido em placas de petri identificadas e esterilizadas, contendo 1 ml deste mesmo meio de cultura, com uma concentração de 10⁹ rizóbios/ml. Nas placas de petri, após a solidificação do meio com as bactérias, distribuiu-se, de forma ordenada sobre o mesmo, os sete discos de papel impregnados, correspondentes aos 7

níveis de cada antibiótico, incubando-se em câmara de crescimento a 28⁰ C. No quinto dia de incubação foi avaliada a formação de halos inibitórios de desenvolvimento de bactérias sobre o meio.

3.7. Avaliação da habilidade de isolados de *Rhizobium leguminosarum* em infectar raízes de *Leucaena leucocephala*

Colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, obtidas por meio de replicagem do material armazenado no meio YM inclinado, foram desprendidas das placas de petri com uma solução salina esterilizada de cloreto de sódio a 0,4 %. A seguir transferiu-se 1 ml dessa suspensão para um frasco erlenmeyer contendo 25 ml do meio YM líquido, incubando-se à temperatura ambiente e sob agitação constante, durante 4 dias, até a obtenção de uma concentração aproximada de 10⁹ rizóbios/ml de meio. Os inoculantes, assim produzidos, foram usados para inocular plântulas de leucena (*Leucaena leucocephala*) e assim possibilitar a identificação de estirpes de *Rhizobium* do tipo II e I, ou seja, rizóbios de feijoeiro com habilidade ou não de infectar leguminosas de outros gêneros, respectivamente.

O teste de infectividade de isolados de

Rhizobium de feijoeiro em plantas de leucena foi desenvolvido em casa de vegetação utilizando-se o sistema de vasos Leonard modificado (VINCENT, 1970), utilizando-se a mesma técnica descrita no item 3.4.

Em cada vaso foram semeadas 4 sementes de *Leucaena*, as quais foram escarificadas por meio de imersão em ácido sulfúrico concentrado, durante 10 minutos, e a seguir lavadas 6 vezes sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada.

Quatro dias após a emergência das plântulas foi feito o desbaste, deixando-se apenas 2 plantas por vaso. A seguir procedeu-se a inoculação das plântulas com o inoculante previamente elaborado. A inoculação foi realizada com 10 ml de inoculante por vaso.

Os vasos foram irrigados com solução nutritiva de Hoagland, descrita no Apêndice 2, alternando-se com água destilada, deionizada e esterilizada, por um período de 60 dias.

O experimento foi conduzido com 140 estirpes de *Rhizobium* e 2 testemunhas sem inoculação. Os tratamentos testemunhas foram compostos por um vaso cultivado com plantas de *Leucaena* e outro com plantas de feijoeiro, para determinar possíveis contaminantes.

A colheita foi realizada 60 dias após a germinação, avaliando-se a presença, ou não, de nódulos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características da acidez dos solos utilizados para isolamento de estirpes de *Rhizobium*

As características de acidez das 31 amostras de solo, coletadas em 11 municípios do interior do estado de São Paulo, expressas pelo pH em água e pelas concentrações de hidrogênio e alumínio trocáveis, estão discriminadas na Tabela 1.

Das 31 amostras de solo, 27 apresentaram valores de pH inferiores a 6,0 e teores de alumínio trocável superiores a 0,03 me/100 g de solo, caracterizando esses solos como de carácter ácido. Os solos com valores de pH superiores a 6,0 e concentrações de alumínio trocável inferiores a 0,03 me/100 g de solo, certamente, são solos que sofreram correção da acidez por meio de calagem, visto que a região de amostragem é tipicamente, de solos ácidos.

Muito embora, o feijoeiro nessa região, não receba inoculação com rizóbios, todas as amostras de solo,

Tabela 1. Local de amostragem dos solos, para o isolamento de rizóbios nativos de feijoeiro, e as análises químicas das respectivas amostras de solo

Município	Local	Análise Química				Isolado de Rhizobium
		pH água	Al ³⁺ -----	H ⁺ me/100g solo	Al ³⁺ + H ⁺ -----	
Tatuí-SP	1	5,22	0,54	0,40	0,94	CM 201-205
Itapetininga-SP	1	5,00	0,33	0,09	0,42	CM 206-210
	2	4,76	0,52	0,20	0,72	CM 211-215
Capão Bonito-SP	1	5,40	0,32	0,20	0,52	CM 216-220
	2	4,66	0,40	0,19	0,59	CM 221-225
	3	5,25	0,12	0,13	0,25	CM 226-230
	4	6,07	0,01	0,08	0,09	CM 231-235
Itapeva-SP	1	6,06	0,02	0,10	0,12	CM 236-240
	2	6,28	0,01	0,10	0,11	CM 241-245
	3	5,42	0,08	0,10	0,18	CM 246-250
	4	5,36	0,29	0,08	0,37	CM 251-255
	5	5,34	0,02	0,11	0,13	CM 256-260
Itaberá-SP	1	5,61	0,09	0,16	0,25	CM 261-265
	2	5,40	0,18	0,08	0,26	CM 266-270
	3	5,09	0,52	0,07	0,59	CM 271-275
	4	5,72	0,03	0,10	0,13	CM 276-280
	5	5,41	0,09	0,14	0,23	CM 281-285
Itararé-SP	1	6,13	0,03	0,10	0,13	CM 286-290
	2	5,46	0,13	0,08	0,21	CM 291-295
	3	5,85	0,03	0,15	0,18	CM 296-300
	4	5,34	0,39	0,22	0,66	CM 301-305
	5	5,29	0,41	0,16	0,64	CM 306-310
Riversul-SP	1	5,05	0,48	0,14	0,62	CM 311-315
	2	4,90	0,53	0,24	0,77	CM 316-320
Itaporanga-SP	1	5,90	0,08	0,15	0,23	CM 321-325
	2	4,84	0,48	0,19	0,67	CM 326-330
	3	5,14	0,42	0,17	0,59	CM 331-335
Taquarituba-SP	1	5,45	0,23	0,21	0,44	CM 336-340
	2	4,97	0,18	0,23	0,41	CM 341-345
Itaí-SP	1	5,39	0,55	0,17	0,71	CM 346
Paranapanema-SP	1	4,52	0,52	0,18	0,70	CM 347-351

CM = CENA/Microbiologia

Independendentemente do nível de acidez, proporcionaram abundante nodulação nas plantas de feijoeiro utilizadas como hospedeiro para o isolamento de *Rhizobium*. Os isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* obtidos desses solos, estão apresentados na Tabela 1.

4.2. Características morfológicas das colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* isoladas

As características morfológicas das 151 colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, isoladas das 31 amostras de solo estudadas, descritas após 5 dias de incubação em meio de cultura com extrato levedura e manitol, adicionado da solução indicadora vermelho congo, encontram-se discriminadas na Tabela 2.

É perceptível que as estirpes não apresentaram grandes variações morfológicas entre si, predominando colônias de forma circular, elevação convexa, superfície lisa-brilhante, cor rósea, devido a ação do vermelho congo, textura opaca, consistência gomosa e presença de odor.

Todos os isolados apresentaram as mesmas características quanto a forma (circular), elevação (convexa), superfície (lisa-brilhante) e odor (presente). Quanto a cor, textura e consistência houve apenas duas

Tabela 2. Características gerais das colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* após 5 dias de crescimento em meio de cultura com extrato levedura e manitol, adicionado da solução indicadora vermelho congo

Isolado	Forma	Elevação	Superfície	Cor	Textura	Consistência	Odor
CM 201	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 202	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 203	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 204	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 205	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 206	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 207	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 208	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 209	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 210	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 211	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 212	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 213	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 214	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 215	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 216	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 217	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 218	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 219	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 220	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 221	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 222	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 223	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 224	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 225	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 226	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 227	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 228	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 229	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 230	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 231	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 232	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 233	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 234	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 235	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 236	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 237	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 238	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 239	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 240	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 241	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 242	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente

Tabela 2. Características gerais das colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* após 5 dias de crescimento em meio de cultura com extrato levedura e manitol, adicionado da solução indicadora vermelho congo (continuação)

Isolado	Forma	Elevação	Superfície	Cor	Textura	Consistência	Odor
CM 243	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 244	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 245	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 246	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 247	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 248	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 249	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 250	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 251	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 252	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 253	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 254	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 255	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 256	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 257	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 258	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 259	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 260	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 261	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 262	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 263	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 264	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 265	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 266	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 267	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 268	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 269	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 270	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 271	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 272	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 273	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 274	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 275	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 276	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 277	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 278	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 279	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 280	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 281	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 282	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 283	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 284	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente

Tabela 2. Características gerais das colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* após 5 dias de crescimento em meio de cultura com extrato levedura e manitol, adicionado da solução indicadora vermelho congo (continuação)

Isolado	Forma	Elevação	Superfície	Cor	Textura	Consistência	Odor
CM 285	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 286	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 287	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 288	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 289	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 290	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 291	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 292	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 293	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 294	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 295	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 296	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 297	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 298	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 299	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 300	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 301	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 302	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 303	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 304	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 305	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Translúcida	Gomosa	Presente
CM 306	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 307	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 308	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 309	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 310	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 311	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 312	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 313	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 314	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 315	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 316	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 317	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 318	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 319	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 320	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Roxa	Opaca	Gomosa	Presente
CM 321	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 322	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 323	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 324	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 325	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 326	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente

Tabela 2. Características gerais das colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* após 5 dias de crescimento em meio de cultura com extrato levedura e manitol, adicionado da solução indicadora vermelho congo (continuação)

Isolado	Forma	Elevação	Superfície	Cor	Textura	Consistência	Odor
CM 327	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 328	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 329	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 330	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 331	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 332	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 333	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 334	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 335	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 336	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 337	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 338	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 339	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 340	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 341	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 342	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 343	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 344	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 345	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 346	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Viscosa	Presente
CM 347	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 348	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 349	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 350	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Opaca	Gomosa	Presente
CM 351	Circular	Convexa	Lisa-brilhante	Rósea	Translúcida	Gomosa	Presente

variações para cada uma destas características. As cores foram rósea e roxa, sendo a maioria das estirpes, ou seja, 83 %, de cor rósea. As texturas observadas foram opaca e translúcida, com predominância para a opaca com 76 % dos casos, e a consistência oscilou entre viscosa e gomosa com um percentual de 66 % das estirpes gomosas.

4.3. Capacidade infectiva e eficiência de fixação de nitrogênio atmosférico de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em *Phaseolus vulgaris*

Os resultados referentes à produção de matéria seca da parte aérea e das raízes, das plantas de feijoeiro, e ao número e massa de nódulos, obtidos das 151 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* estudadas, encontram-se discriminados na Tabela 3.

Observou-se que dos 151 isolados testados para infectividade e fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, 6 não infectaram as plantas de feijoeiro sendo considerados contaminantes. Outros 10 isolados nodularam, porém a massa de nódulos foi inferior a 1 mg/planta (Tabela 3). Dos 135 isolados restantes, apenas 108, ou seja, 72 % do total, produziram nódulos com capacidade de reduzir o acetileno, atividade esta, indicadora da potencialidade do *Rhizobium* em fixar, biologicamente, o

Tabela 3. Produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de feijoeiro e número de nódulos e massa de nódulos secos produzidos por 151 isolados de *Rhizobium*

Isolado	Número de Nódulo	Matéria Seca			Isolado	Número de Nódulo	Matéria Seca		
		Nódulo	Parte Aérea	Raiz			Nódulo	Parte Aérea	Raiz
g					g				
CH 201	402	0,300	2,00	0,90	CH 277	54	0,026	0,63	0,44
CH 202	311	0,200	2,50	0,37	CH 278	39	0,007	0,58	0,37
CH 203	336	0,340	2,50	0,65	CH 279	45	0,008	0,57	0,51
CH 204	217	0,230	2,00	0,57	CH 280	206	0,026	0,50	0,41
CH 205	274	0,200	1,30	0,37	CH 281	406	0,063	0,50	0,43
CH 206	341	0,300	2,40	0,59	CH 282	314	0,082	0,62	0,50
CH 207	292	0,100	2,20	0,32	CH 283	136	0,032	0,64	0,51
CH 208	285	0,300	2,40	0,73	CH 284	202	0,020	0,54	0,48
CH 209	351	0,300	2,00	0,58	CH 285	19	0,005	0,66	0,64
CH 210	478	0,220	0,70	0,59	CH 286	286	0,100	0,48	0,24
CH 211	229	0,310	2,70	0,62	CH 287	266	0,040	0,52	0,47
CH 212	313	0,220	2,10	0,52	CH 288	19	0,005	0,66	0,64
CH 213	224	0,210	1,10	0,58	CH 289	40	0,017	0,52	0,49
CH 214	263	0,300	3,20	0,52	CH 290	127	0,030	0,62	0,27
CH 215	206	0,250	2,50	0,97	CH 291	237	0,080	0,42	0,25
CH 216	251	0,270	0,50	0,54	CH 292	266	0,110	0,47	0,27
CH 217	198	0,110	0,65	0,46	CH 293	185	0,140	0,71	0,37
CH 218	97	0,090	0,56	0,66	CH 294	266	0,110	0,74	0,37
CH 219	104	0,130	0,72	0,57	CH 295	123	0,050	0,44	0,29
CH 220	96	0,160	0,49	0,59	CH 296	371	0,200	2,50	1,00
CH 221	301	0,320	0,76	0,63	CH 297	317	0,300	2,10	0,67
CH 222	209	0,190	0,62	0,47	CH 298	211	0,200	1,00	0,37
CH 223	216	0,240	0,73	0,57	CH 299	229	0,200	2,10	0,64
CH 224	184	0,290	0,68	0,80	CH 300	262	0,200	2,80	1,00
CH 225	91	0,040	0,53	0,45	CH 301	133	0,024	0,56	0,43
CH 226	80	0,050	0,66	0,30	CH 302	106	0,008	0,53	0,41
CH 227	265	0,060	1,56	0,21	CH 303	69	0,008	0,50	0,52
CH 228	161	0,100	0,61	0,36	CH 304	165	0,028	0,60	0,64
CH 229	312	0,180	1,29	0,34	CH 305	51	0,003	0,58	0,42
CH 230	121	0,080	1,12	0,41	CH 306	140	0,200	1,90	1,04
CH 231	210	0,110	1,19	0,33	CH 307	202	0,300	2,00	0,51
CH 232	213	0,110	0,57	0,27	CH 308	271	0,300	2,30	0,43
CH 233	181	0,150	1,63	0,35	CH 309	222	0,210	2,30	0,69
CH 234	113	0,190	1,98	0,40	CH 310	187	0,200	1,70	0,52
CH 235	164	0,170	1,46	0,45	CH 311	225	0,019	0,59	0,53
CH 236	56	0,008	0,76	0,57	CH 312	0	0,000	0,56	0,52
CH 237	31	0,001	0,58	0,61	CH 313	42	0,011	0,55	0,51
CH 238	0	0,000	0,55	0,48	CH 314	5	0,001	0,58	0,57
CH 239	28	0,180	0,58	0,58	CH 315	0	0,000	0,45	0,53
CH 240	51	0,001	0,62	0,37	CH 316	41	0,030	0,42	0,26

Tabela 3. Produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de feijoeiro e número de nódulos e massa de nódulos secos produzidos por 151 isolados de *Rhizobium* (continuação)

Isolado	Número de Nódulo	Matéria Seca			Isolado	Número de Nódulo	Matéria Seca		
		Nódulo	Parte Aérea	Raiz			Nódulo	Parte Aérea	Raiz
		g					g		
CN 241	32	0,009	0,52	0,45	CN 317	16	0,001	0,45	0,38
CN 242	52	0,007	0,41	0,48	CN 318	26	0,001	0,43	0,31
CN 243	46	0,005	0,48	0,45	CN 319	32	0,001	0,48	0,34
CN 244	29	0,006	0,49	0,66	CN 320	18	0,001	0,36	0,29
CN 245	38	0,008	0,64	0,49	CN 321	110	0,210	1,40	0,53
CN 246	68	0,005	0,45	0,45	CN 322	212	0,230	1,80	0,42
CN 247	0	0,000	0,60	0,53	CN 323	249	0,350	1,60	0,65
CN 248	36	0,008	0,70	0,58	CN 324	249	0,280	1,90	0,24
CN 249	65	0,009	0,53	0,76	CN 325	242	0,240	1,90	0,61
CN 250	15	0,005	0,46	0,55	CN 326	59	0,007	0,70	0,64
CN 251	*	*	*	*	CN 327	66	0,020	0,55	0,41
CN 252	*	*	*	*	CN 328	65	0,021	0,54	0,58
CN 253	0	0,000	0,52	0,64	CN 329	89	0,034	0,46	0,56
CN 254	77	0,018	0,48	0,52	CN 330	56	0,028	0,49	0,59
CN 255	63	0,013	0,48	0,53	CN 331	0	0,000	0,62	0,56
CN 256	220	0,049	0,45	0,46	CN 332	21	0,001	0,58	0,55
CN 257	148	0,038	0,60	0,43	CN 333	35	0,005	0,72	0,57
CN 258	117	0,001	0,45	0,39	CN 334	29	0,010	0,52	0,56
CN 259	54	0,010	0,56	0,42	CN 335	36	0,001	0,90	0,88
CN 260	93	0,007	0,49	0,35	CN 336	189	0,020	0,41	0,23
CN 261	86	0,034	0,29	0,48	CN 337	35	0,010	0,63	0,22
CN 262	94	0,030	0,42	0,49	CN 338	82	0,030	0,70	0,44
CN 263	39	0,032	0,41	0,53	CN 339	112	0,010	0,19	0,20
CN 264	41	0,016	0,59	0,59	CN 340	104	0,100	0,54	0,31
CN 265	*	*	*	*	CN 341	313	0,240	1,80	0,60
CN 266	28	0,017	0,76	0,46	CN 342	196	0,200	1,30	0,75
CN 267	106	0,007	0,71	0,48	CN 343	134	0,230	2,40	0,83
CN 268	82	0,017	0,62	0,46	CN 344	272	0,250	1,90	0,82
CN 269	196	0,021	0,45	0,38	CN 345	152	0,100	1,40	0,58
CN 270	85	0,008	0,63	0,48	CN 346	206	0,002	1,48	0,67
CN 271	161	0,003	0,56	0,43	CN 347	223	0,190	1,70	0,54
CN 272	51	0,002	0,53	0,39	CN 348	225	0,100	1,60	0,37
CN 273	93	0,120	0,69	0,39	CN 349	237	0,210	1,90	0,58
CN 274	64	0,040	0,56	0,32	CN 350	297	0,400	2,60	0,70
CN 275	120	0,030	0,43	0,32	CN 351	210	0,200	1,10	0,53
CN 276	62	0,040	0,56	0,48	CN 02	221	0,095	1,20	0,54

* = planta perdida

nitrogênio atmosférico.

A diversidade entre os isolados, quanto a atividade de redução de acetileno (ARA), foi extremamente elevada. Os valores máximos observados para essa atividade foram de 42,35 e 41,85 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$, respectivamente, para as estirpes CM 322 e CM 206. Esses valores representam um potencial superior a 5 vezes aquele observado para a estirpe testemunha, CM 02 (CIAT 899) que foi de 7,95 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$ (Tabela 4). Além dessas 2 estirpes, que se destacaram das demais, pelos elevados valores para a ARA, aproximadamente 10 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$ acima da terceira estirpe mais produtiva, outros 38 isolados apresentaram valores dessa atividade superiores a testemunha.

Os coeficientes de correlação obtidos para as relações entre a ARA e a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de feijoeiro e a massa e o número de nódulos, foram, respectivamente, 0,5822, 0,6937 e 0,5996. Essas correlações são relativamente baixas, porém altamente significativas. A ARA não correlacionou-se significativamente com a massa de raízes. As correlações positivas entre a atividade da nitrogenase, a massa de nódulos e a matéria seca da parte aérea das plantas, estão de acordo com os resultados reportados por ROMERO et alii (1988), autores estes que consideram a ARA como uma técnica apropriada para a seleção de estirpes eficientes na fixação

de nitrogênio. Contudo, PORTUGAL (1986), trabalhando com estirpes de *Rhizobium meliloti*, em plantas de alfafa, sugere que mesmo havendo correlação positiva entre a atividade da nitrogenase e a massa de matéria seca da parte aérea da planta, a simples avaliação da ARA não é suficiente para selecionar estirpes com capacidade para fixação de nitrogênio. Essa afirmativa está fundamentada no fato de que provavelmente, haja interações entre a estirpe e a planta hospedeira.

A massa da parte aérea das plantas de feijoeiro apresentou correlações altamente significativas com os parâmetros massa e número de nódulos, atingindo coeficientes de correlação da ordem de 0,7722 e 0,5552, respectivamente. O número de nódulos também correlacionou-se de forma significativa com a massa de nódulos, apresentando um coeficiente de correlação de 0,7104. Como as correlações entre esses parâmetros, a exemplo das correlações com a ARA, são baixas, observa-se na Tabela 4 que nem todas as estirpes, com a ARA maior do que a testemunha, produziram matéria seca e número de nódulos, maiores do que a testemunha. Dessa forma é possível sugerir as 40 estirpes com atividade de redução de acetileno maior do que a testemunha CM 02 (CIAT 899) como materiais básicos para o aprimoramento de estudos no sentido de produzir inoculantes mais eficientes na fixação de nitrogênio.

Tabela 4. Atividade da enzima nitrogenase de estirpes de *Rhizobium*, número e massa de nódulos produzidos e produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de plantas de feijoeiro

Isolado	Atividade total Nitrogenase	Matéria Seca			Número de Nódulo
		Nódulo	Parte Aérea	Raíz	
	$\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{pl.t.h}$		g		
CM 322	42,35	0,230	1,80	0,42	212
CM 206	41,85	0,300	2,40	0,59	341
CM 209	31,81	0,300	2,00	0,58	351
CM 208	29,80	0,300	2,40	0,73	285
CM 325	28,13	0,240	1,90	0,61	242
CM 213	24,61	0,210	1,10	0,58	224
CM 298	23,66	0,200	1,00	0,37	211
CM 202	23,44	0,200	2,50	0,37	311
CM 205	23,44	0,200	1,30	0,37	274
CM 201	23,44	0,300	2,00	0,90	402
CM 350	20,98	0,400	2,60	0,70	297
CM 234	19,08	0,190	1,98	0,40	113
CM 210	18,42	0,220	0,70	0,59	478
CM 233	18,42	0,150	1,63	0,35	181
CM 232	17,80	0,110	0,57	0,27	213
CM 297	17,41	0,300	2,10	0,67	317
CM 204	17,20	0,290	2,00	0,57	217
CM 212	17,19	0,220	2,10	0,52	313
CM 203	16,32	0,340	2,50	0,65	336
CM 324	16,25	0,280	1,90	0,24	249
CM 216	15,97	0,270	0,50	0,54	251
CM 351	14,73	0,200	1,10	0,53	210
CM 211	13,84	0,310	2,70	0,62	229
CM 217	13,75	0,110	0,65	0,46	198
CM 222	13,15	0,190	0,62	0,47	209
CM 214	13,06	0,300	3,20	0,52	263
CM 300	12,72	0,200	2,80	1,00	262
CM 273	12,72	0,120	0,69	0,39	93
CM 348	11,61	0,100	1,60	0,37	225
CM 223	11,25	0,240	0,73	0,57	216
CM 282	10,98	0,082	0,62	0,50	314
CM 231	10,44	0,110	1,19	0,33	210
CM 281	8,86	0,083	0,50	0,43	406
CM 229	8,84	0,180	1,29	0,34	312
CM 207	8,71	0,100	2,20	0,32	292
CM 310	8,71	0,200	1,70	0,52	187
CM 347	8,37	0,100	1,70	0,54	223
CM 215	8,09	0,250	2,50	0,97	208

Tabela 4. Atividade da enzima nitrogenase de estirpes de *Rhizobium*, número e massa de nódulos produzidos e produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de plantas de feijoeiro (continuação)

Isolado	Atividade total Nitrogenase	Matéria Seca			Número de Nódulo
		Nódulo	Parte Aérea	Raíz	
	$\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{pl.t.h}$	g			
CM 296	8,04	0,200	2,50	1,00	371
CM 321	7,97	0,210	1,40	0,53	110
CM 02	7,95	0,095	1,20	0,54	221
CM 323	7,42	0,350	1,60	0,65	249
CM 256	7,38	0,049	0,45	0,46	220
CM 349	7,03	0,210	1,90	0,58	237
CM 230	6,70	0,080	1,12	0,41	121
CM 219	6,53	0,130	0,72	0,57	104
CM 257	6,11	0,038	0,60	0,43	148
CM 218	5,93	0,090	0,58	0,66	87
CM 343	5,90	0,230	2,40	0,83	134
CM 299	5,58	0,200	2,10	0,64	229
CM 345	5,58	0,100	1,40	0,58	152
CM 342	5,36	0,200	1,30	0,75	196
CM 221	5,36	0,320	0,78	0,63	301
CM 344	5,30	0,250	1,90	0,82	272
CM 306	5,13	0,200	1,90	1,40	140
CM 225	5,13	0,040	0,53	0,45	91
CM 224	4,85	0,290	0,68	0,80	184
CM 326	4,69	0,070	0,70	0,64	59
CM 274	4,69	0,040	0,56	0,32	64
CM 275	4,52	0,030	0,43	0,32	120
CM 277	3,92	0,026	0,63	0,44	54
CM 311	3,77	0,018	0,59	0,53	225
CM 338	3,68	0,030	0,70	0,44	82
CM 329	3,60	0,034	0,48	0,56	89
CM 228	3,57	0,100	0,61	0,36	161
CM 262	3,55	0,030	0,42	0,49	94
CM 283	3,39	0,032	0,64	0,51	136
CM 309	3,28	0,210	2,30	0,69	222
CM 341	3,21	0,240	1,80	0,60	313
CM 260	3,19	0,028	0,50	0,41	206
CM 292	3,07	0,110	0,47	0,27	266
CM 240	3,01	0,001	0,62	0,37	51
CM 254	2,91	0,018	0,48	0,52	77
CM 276	2,90	0,040	0,56	0,48	62
CM 286	2,79	0,100	0,48	0,24	286
CM 261	2,77	0,034	0,29	0,48	86

Tabela 4. Atividade da enzima nitrogenase de estirpes de *Rhizobium*, número e massa de nódulos produzidos e produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de plantas de feijoeiro (continuação)

Isolado	Atividade total Nitrogenase	Matéria Seca			Número de Nódulo
		Nódulo	Parte Aérea	Raíz	
	$\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{pl.t.h}$		g		
CM 340	2,68	0,100	0,54	0,31	104
CM 286	2,56	0,017	0,76	0,46	28
CM 293	2,50	0,140	0,71	0,37	185
CM 336	2,17	0,020	0,41	0,23	189
CM 301	2,12	0,024	0,56	0,43	133
CM 258	1,90	0,011	0,45	0,39	117
CM 284	1,47	0,020	0,54	0,48	202
CM 226	1,45	0,050	0,66	0,30	80
CM 294	1,23	0,110	0,74	0,37	266
CM 304	1,09	0,028	0,60	0,64	165
CM 269	1,08	0,021	0,45	0,38	196
CM 339	1,00	0,010	0,19	0,20	112
CM 267	0,98	0,007	0,71	0,48	106
CM 242	0,94	0,007	0,41	0,48	52
CM 313	0,80	0,011	0,55	0,51	42
CM 337	0,74	0,010	0,63	0,22	35
CM 278	0,68	0,007	0,58	0,37	39
CM 249	0,65	0,009	0,53	0,76	65
CM 290	0,60	0,030	0,62	0,27	127
CM 236	0,58	0,008	0,76	0,57	56
CM 237	0,56	0,001	0,58	0,61	31
CM 303	0,48	0,008	0,50	0,52	69
CM 268	0,47	0,017	0,62	0,46	82
CM 289	0,47	0,017	0,52	0,49	40
CM 260	0,43	0,007	0,49	0,35	93
CM 250	0,42	0,005	0,46	0,55	15
CM 302	0,32	0,008	0,53	0,41	106
CM 272	0,27	0,002	0,53	0,39	51
CM 259	0,26	0,010	0,56	0,42	54
CM 270	0,15	0,008	0,63	0,48	85
CM 248	0,09	0,008	0,70	0,58	36
CM 288	0,08	0,005	0,66	0,64	19
CM 271	0,04	0,003	0,56	0,43	161

4.4. Tolerância de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a pH baixo e à toxidez de alumínio

Os resultados dos testes de tolerância aos fatores de acidez, pH 4,5 e pH 4,5 + 100 µM de alumínio, das 151 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, isoladas das 31 amostras de solo estudadas, estão dispostos no Tabela 5.

Os isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, testados para tolerância à acidez e à toxidez de alumínio, apresentaram diferenciações com relação ao crescimento em meio de cultura com o pH 4,5 e com o pH 4,5 + 100 µM de alumínio. A tolerância ao pH 4,5 não conferiu a mesma capacidade da estirpe em formar colônias isoladas quando o meio era ácido e continha 100 µM de alumínio (Tabela 5). VARGAS & GRAHAM (1988), encontraram resultados similares, selecionando isolados de *Rhizobium* para estas mesmas características. A justificativa para esse comportamento, pode estar fundamentada nos mecanismos de tolerância desses microorganismos aos fatores de acidez, pH e alumínio, os quais provavelmente, sejam diferentes.

Dos 151 isolados testados, 110, ou seja, aproximadamente, 73 %, mostraram-se tolerantes a pH 4,5, sendo que 78 destes, ou seja, 52 %, cresceram no mesmo meio acrescido de 100 µM de alumínio. Esses resultados se

Tabela 5. Tolerância de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a fatores de acidez do solo

Isolado	pH 4,5	pH 4,5 + Al ³⁺	Isolado	pH 4,5	pH 4,5 + Al ³⁺
CH 201	+	+	CH 277	-	-
CH 202	+	+	CH 278	+	+
CH 203	+	+	CH 279	+	+
CH 204	+	+	CH 280	+	+
CH 205	+	+	CH 281	-	-
CH 206	+	+	CH 282	+	+
CH 207	-	-	CH 283	+	+
CH 208	-	-	CH 284	-	-
CH 209	-	-	CH 285	-	-
CH 210	-	-	CH 286	-	-
CH 211	+	+	CH 287	-	-
CH 212	+	+	CH 288	-	-
CH 213	+	+	CH 289	-	-
CH 214	+	+	CH 290	-	-
CH 215	+	+	CH 291	+	+
CH 216	+	+	CH 292	-	-
CH 217	+	+	CH 293	+	+
CH 218	+	+	CH 294	+	-
CH 219	+	+	CH 295	+	+
CH 220	+	+	CH 296	+	-
CH 221	+	+	CH 297	+	-
CH 222	+	+	CH 298	+	-
CH 223	+	+	CH 299	+	-
CH 224	+	+	CH 300	+	-
CH 225	+	+	CH 301	+	+
CH 226	+	+	CH 302	-	-
CH 227	-	-	CH 303	-	-
CH 228	-	-	CH 304	+	-
CH 229	+	+	CH 305	+	-
CH 230	+	+	CH 306	+	-
CH 231	+	+	CH 307	+	+
CH 232	-	-	CH 308	+	-
CH 233	-	-	CH 309	+	-
CH 234	-	-	CH 310	+	-
CH 235	-	-	CH 311	+	-
CH 236	-	-	CH 312	+	+
CH 237	+	+	CH 313	+	-
CH 238	-	-	CH 314	-	-
CH 239	-	-	CH 315	+	+
CH 240	-	-	CH 316	+	+
CH 241	+	+	CH 317	+	+
CH 242	+	+	CH 318	+	+
CH 243	+	-	CH 319	+	+

Tabela 5. Tolerância de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a fatores de acidez do solo (continuação)

Isolado	pH 4,5	pH 4,5 + Al3+	Isolado	pH 4,5	pH 4,5 + Al3+
CN 244	+	+	CN 320	+	+
CN 245	+	+	CN 321	+	+
CN 246	+	+	CN 322	+	+
CN 247	+	+	CN 323	+	+
CN 248	-	-	CN 324	+	+
CN 249	+	+	CN 325	+	+
CN 250	+	+	CN 326	-	-
CN 251	+	+	CN 327	-	-
CN 252	+	+	CN 328	-	-
CN 253	+	+	CN 329	-	-
CN 254	+	+	CN 330	-	-
CN 255	+	+	CN 331	+	+
CN 256	+	-	CN 332	+	-
CN 257	+	+	CN 333	-	-
CN 258	+	+	CN 334	-	-
CN 259	+	-	CN 335	-	-
CN 260	+	+	CN 336	+	-
CN 261	+	+	CN 337	+	-
CN 262	+	-	CN 338	+	-
CN 263	+	-	CN 339	+	-
CN 264	-	-	CN 340	+	-
CN 265	-	-	CN 341	+	-
CN 266	-	-	CN 342	+	-
CN 267	+	+	CN 343	+	-
CN 268	+	+	CN 344	+	-
CN 269	-	-	CN 345	+	-
CN 270	+	+	CN 346	-	-
CN 271	+	+	CN 347	+	+
CN 272	+	+	CN 348	+	+
CN 273	+	+	CN 349	+	+
CN 274	+	+	CN 350	+	+
CN 275	+	-	CN 351	+	+
CN 276	+	-	CN 02	+	+

“+” ou “-” = Formação, ou não, de colônias de isolados em placas, com 4 dias de incubação a 28 C

assemelham as observações realizadas por KEYSER & MUNNS (1979) de que apenas 40 % das estirpes tolerantes a pH 4,5 toleraram níveis tóxicos de alumínio. Contudo, aqui o percentual de estirpes tolerantes a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio foi de, aproximadamente, 71 % daquelas tolerantes ao pH 4,5.

Os percentuais de 73 % de estirpes tolerantes a pH 4,5 e de 52 % de estirpes tolerantes a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio provavelmente estejam relacionados com os fatores de acidez dos solos dos quais foram isoladas. Essa suposição está baseada nos resultados obtidos por GRAHAM et alii (1982) e VARGAS & GRAHAM (1988). GRAHAM et alii (1982), selecionando estirpes de *Rhizobium* para tolerância a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio, estirpes estas isoladas de solos dos EUA provavelmente solos não ácidos, encontraram apenas 10 % dos isolados testados tolerantes a estes fatores de acidez. VARGAS & GRAHAM (1988), com os mesmos objetivos, trabalhando com estirpes de *Rhizobium* provenientes principalmente da América Latina, onde é frequente a existência de solos ácidos, selecionaram 36% dos isolados testados, como tolerantes a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio. Ao comparar-se o número de estirpes isoladas em cada classe de pH com o número de estirpes tolerantes a pH 4,5 e a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio (Tabela 6 e Figura 1) obteve-se correlações da ordem de 89,92 % e de 80,63 %,

respectivamente. Ao realizar-se esse mesmo tipo de análise, para as classes de concentração de alumínio trocável (Tabela 7 e Figura 2), as correlações obtidas foram igualmente elevadas, sendo da ordem de 93,17 % para a tolerância ao pH 4,5, e de 77,58 % para a tolerância a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio. É também perceptível nesses resultados (Tabelas 6 e 7) que o alumínio é mais limitante ao crescimento de *Rhizobium* do que o pH baixo, uma vez que o número de estirpes tolerantes ao fator pH 4,5 + 100 μ M de alumínio sempre foi inferior, ou no máximo igual, ao número de estirpes tolerantes ao pH, concordando, mais uma vez com as informações da literatura (VARGAS & GRAHAM, 1988; KEYSER & MUNNS, 1979).

As correlações relativamente elevadas neste estudo confirmam a suposição de que há uma relação direta entre o nível de acidez do solo e o número de estirpes tolerantes a pH baixo e a níveis tóxicos de alumínio. Contudo, a observação da existência de estirpes de *Rhizobium*, isoladas de amostras de solo com pH elevado e sem toxidez de alumínio, tolerantes a pH 4,5 + 100 μ M de alumínio (Tabela 6), presume que pode ter havido adaptações gradativas destes microorganismos à acidez. Essa suposição está fundamentada no fato de que as áreas amostradas, antes de serem cultivadas com feijoeiro, sofreram calagem e, assim, a flora bacteriana atual, representa, possivelmente,

Tabela 6. Relação entre o número de estirpes de *Rhizobium* isoladas e tolerantes a fatores de acidez para cada classe de pH das amostras de solo estudadas

Classe de pH do solo	Número de Estirpes		
	Isoladas	Tolerantes	
		pH 4,5	pH 4,5 + Al
4,50 - 4,80	15	15	15
4,81 - 5,10	30	20	12
5,11 - 5,40	46	36	27
5,41 - 5,70	25	18	10
5,71 - 6,00	15	14	8
6,01 - 6,30	20	7	6

Tabela 7. Relação entre o número de estirpes de *Rhizobium* isoladas e tolerantes a fatores de acidez para cada classe de Al trocável das amostras de solo estudadas

Classe de Al trocável do solo	Número de Estirpes		
	Isoladas	Tolerantes	
		pH 4,5	pH 4,5 + Al
0,55 - 0,45	36	29	26
0,44 - 0,35	20	15	8
0,34 - 0,25	15	11	11
0,24 - 0,15	15	13	3
0,14 - 0,05	30	21	18
< 0,05	35	21	12

Figura 1. Relacao entre o numero de isolados por classe de pH do solo e o numero de estirpes tolerantes a fatores de acidez

Figura 2. Relacao entre o número de isolados por classe de aluminio trocavel do solo e o numero de estirpes tolerantes a fatores de acidez

uma população remanescente de *Rhizobium*, selecionada naturalmente para sobreviver em meio ácido. ROBSON & LONERAGAN (1970) citam que as diferenças observadas entre estirpes de *Rhizobium meliloti*, na capacidade de formação de nódulos no segundo ano de cultivo de alfafa, podem estar relacionadas com a habilidade dos isolados em colonizar o solo ácido, a partir da inoculação das sementes, realizada no primeiro ano de cultivo.

KEYSER & MUNNS (1979) afirmam que há incertezas de que estirpes de *Rhizobium* selecionadas em meio de cultura, para tolerância a pH ácido e a níveis tóxicos de alumínio, realmente, sejam tolerantes a estes fatores de acidez no solo. Entretanto, considerando-se que em solos extremamente ácidos a concentração de alumínio, na solução do solo, atinge níveis máximos da ordem de 50 μM , a seleção de estirpes para este fator, realizada a uma concentração de 100 μM , certamente, imprime maiores garantias da presença desta característica nos isolados selecionados.

Não foi perceptível nos resultados obtidos uma relação entre a tolerância das estirpes aos fatores de acidez e a atividade de redução de acetileno. Tanto as estirpes infectivas e com elevados valores de ARA como as não infectivas, ou infectivas e com baixos valores de ARA, mostraram-se tolerantes aos fatores de acidez estudados.

Contudo, dentre as 40 estirpes, com atividade de redução de acetileno maior do que a testemunha, 32, ou seja, 80 %, mostraram-se tolerantes ao pH 4,5, e 28, isto é, 70 %, tolerantes ao pH 4,5 + 100 µM de alumínio. As estirpes CM 322 e CM 206 que se destacaram das demais, pela elevada ARA, mostraram-se tolerantes aos fatores de acidez, pH 4,5 e pH 4,5 + 100 µM de alumínio, entretanto as estirpes CM 209 e CM 208, com a terceira e quarta maior ARA, respectivamente, foram sensíveis a estes fatores de acidez.

4.5. Resistência de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a antibióticos

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol, estreptomicina, neomicina, kazuamicina, rifampicina, tetraciclina e espectinomicina, das 151 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, isoladas das 31 amostras de solo estudadas, estão dispostos na Tabela 8.

Os isolados de *Rhizobium* apresentaram comportamentos diferenciados frente às diversas categorias e concentrações de antibióticos testados. Em média, as concentrações mínimas inibitórias mais elevadas, ou seja, maiores do que 100 µg/ml, foram obtidas para as drogas

Tabela 8. Nível máximo de resistência de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, espectinomicina, kazugamicina, rifampicina, tetraciclina e neomicina

Isolado	Nível de Resistência						
	Estrept.	Cloranf.	Espect.	Kazuga.	Rifamp.	Tetrac.	Neomic.
	ug/ml						
CH 201	640	640	40	320	80	80	640
CH 202	20	640	20	640	40	640	40
CH 203	10	640	40	640	80	640	160
CH 204	10	640	40	640	80	640	80
CH 205	20	640	10	640	80	640	320
CH 206	0	160	0	320	80	10	160
CH 207	0	640	10	640	80	320	160
CH 208	160	80	10	320	160	0	320
CH 209	0	640	10	320	160	160	640
CH 210	20	160	10	320	160	320	80
CH 211	0	80	20	640	10	80	40
CH 212	0	80	10	320	10	10	40
CH 213	10	80	20	640	10	10	80
CH 214	0	80	20	320	10	10	80
CH 215	0	40	20	640	10	10	80
CH 216	0	40	10	640	80	10	160
CH 217	10	40	10	320	160	0	80
CH 218	0	80	10	640	80	20	160
CH 219	0	80	10	640	160	0	40
CH 220	0	40	10	640	80	10	20
CH 221	0	160	10	640	160	10	80
CH 222	0	640	0	320	10	10	80
CH 223	0	320	0	640	80	20	80
CH 224	0	40	0	640	80	160	80
CH 225	0	80	10	640	160	80	80
CH 226	0	320	0	320	80	10	640
CH 227	0	320	40	320	320	0	160
CH 228	0	320	0	640	40	0	80
CH 229	0	40	20	320	80	20	160
CH 230	0	160	20	640	80	10	80
CH 231	640	10	80	320	320	0	80
CH 232	0	160	160	320	160	20	160
CH 233	0	320	160	320	320	20	160
CH 234	0	160	20	320	320	10	20
CH 235	640	160	80	320	80	0	40
CH 236	0	80	320	320	160	40	160
CH 237	0	40	160	320	80	40	80
CH 238	0	80	160	320	40	40	80
CH 239	0	640	10	320	80	40	40

Tabela 8. Nível máximo de resistência de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, espectinomicina, kazugamicina, rifampicina, tetraciclina e neomicina (continuação)

Isolado	Nível de Resistência						
	Estrept.	Cloranf.	Espect.	Kazuga.	Rifamp.	Tetrac.	Neomic.
	ug/ml						
CM 240	0	640	160	320	320	40	80
CM 241	0	320	320	320	80	40	160
CM 242	0	80	160	320	80	160	80
CM 243	0	320	320	320	80	40	20
CM 244	0	640	10	320	80	40	40
CM 245	0	80	80	320	160	20	20
CM 246	0	160	20	320	80	320	40
CM 247	0	40	160	320	80	40	40
CM 248	10	640	20	320	80	20	160
CM 249	0	640	80	320	80	20	20
CM 250	0	80	20	320	40	160	40
CM 251	0	160	10	320	160	40	40
CM 252	0	80	40	320	80	160	20
CM 253	0	320	20	640	80	40	20
CM 254	0	320	20	640	80	80	10
CM 255	0	80	10	640	80	80	10
CM 256	0	320	160	320	160	0	40
CM 257	0	80	40	320	160	0	40
CM 258	0	80	20	640	160	0	40
CM 259	0	80	40	320	160	0	20
CM 260	0	40	160	320	160	0	20
CM 261	0	80	80	320	160	20	80
CM 262	0	640	40	320	160	20	40
CM 263	0	640	40	320	160	20	20
CM 264	0	640	80	320	40	10	80
CM 265	0	640	80	320	80	0	40
CM 266	0	640	80	640	320	80	160
CM 267	0	640	40	640	320	80	160
CM 268	0	640	40	640	320	40	160
CM 269	0	320	80	640	80	80	80
CM 270	0	320	40	640	80	20	10
CM 271	0	80	20	320	160	0	10
CM 272	0	80	20	320	160	10	40
CM 273	0	160	10	320	160	20	80
CM 274	0	640	20	320	160	20	40
CM 275	0	80	20	640	80	20	40
CM 276	0	160	10	640	160	20	40
CM 277	0	320	10	640	80	20	80
CM 278	0	80	0	640	80	0	40

Tabela 8. Nível máximo de resistência de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, espectinomicina, kazugamicina, rifampicina, tetraciclina e neomicina (continuação)

Isolado	Nível de Resistência						
	Estrept.	Cloranf.	Espect.	Kazuga.	Rifamp.	Tetrac.	Neomic.
	ug/ml						
CN 279	0	160	10	640	80	20	80
CN 280	0	160	10	640	80	0	80
CN 281	0	640	10	640	40	10	20
CN 282	0	640	10	640	80	10	40
CN 283	0	640	20	640	160	10	160
CN 284	0	640	20	640	80	10	160
CN 285	0	640	20	-	-	10	-
CN 286	0	640	20	640	160	10	80
CN 287	0	80	10	640	320	10	160
CN 288	0	640	10	640	80	0	20
CN 289	0	640	10	640	160	0	160
CN 290	0	640	20	640	160	0	160
CN 291	10	640	10	640	80	80	40
CN 292	0	640	10	640	40	80	160
CN 293	0	640	80	320	20	20	40
CN 294	0	640	10	640	40	80	160
CN 295	0	640	20	640	80	40	80
CN 296	20	640	10	320	80	20	40
CN 297	0	40	20	320	80	40	40
CN 298	10	40	20	320	80	40	40
CN 299	0	80	10	320	80	40	40
CN 300	0	40	20	320	160	40	80
CN 301	0	320	160	640	80	10	160
CN 302	0	640	80	640	80	20	40
CN 303	0	320	80	320	160	10	40
CN 304	0	640	80	320	40	10	160
CN 305	0	320	160	640	80	40	160
CN 306	0	320	10	320	40	20	10
CN 307	0	320	20	320	40	20	10
CN 308	0	320	0	320	160	320	10
CN 309	0	640	20	320	160	10	0
CN 310	0	160	20	320	160	20	10
CN 311	0	320	10	640	160	10	160
CN 312	0	320	20	640	80	10	80
CN 313	0	160	10	640	160	80	20
CN 314	0	80	10	640	160	10	20
CN 315	0	640	10	640	160	10	160
CN 316	0	80	10	320	80	20	20
CN 317	0	640	10	320	80	20	20

Tabela 8. Nível máximo de resistência de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, espectinomicina, kazugamicina, rifampicina, tetraciclina e neomicina (continuação)

Isolado	Nível de Resistência						
	Estrept.	Cloranf.	Espect.	Kazuga.	Rifamp.	Tetrac.	Neomic.
	ug/ml						
CH 318	0	80	10	320	80	20	40
CH 319	0	160	10	320	80	10	20
CH 320	0	640	10	320	40	20	10
CH 321	0	80	0	320	80	80	10
CH 322	0	160	20	320	40	160	20
CH 323	10	80	20	160	80	40	0
CH 324	0	80	20	320	80	10	0
CH 325	0	80	10	320	80	160	0
CH 326	0	640	10	640	80	10	10
CH 327	0	640	20	640	80	10	10
CH 328	0	640	10	640	80	10	10
CH 329	0	40	10	640	80	10	0
CH 330	0	80	10	640	20	10	10
CH 331	0	320	10	640	160	320	20
CH 332	0	160	10	320	160	160	20
CH 333	0	320	10	320	160	320	40
CH 334	0	320	10	640	80	80	10
CH 335	0	320	10	320	320	320	10
CH 336	0	80	10	640	160	640	0
CH 337	0	320	20	320	80	20	80
CH 338	0	160	20	640	80	0	160
CH 339	0	640	20	640	160	20	80
CH 340	0	320	10	640	80	640	0
CH 341	0	80	10	640	80	80	40
CH 342	20	80	10	640	80	640	80
CH 343	0	80	10	320	80	40	160
CH 344	0	40	10	640	80	40	20
CH 345	10	80	10	640	160	80	20
CH 346	0	80	40	320	160	20	20
CH 347	10	80	10	320	160	40	20
CH 348	0	160	10	320	80	80	20
CH 349	0	160	10	320	80	40	20
CH 350	0	80	10	320	160	20	80
CH 351	10	160	10	640	320	20	40

kazugamicina, cloranfenicol e rifampicina (Tabela 9) e as mais baixas, isto é, menores do que 50 ug/ml, para as drogas estreptomicina e espectinomicina.

A estreptomicina caracterizou-se como a droga mais letal, ao apresentar 131 estirpes, ou seja, 87 % do total, sensíveis à concentração mínima de 10 ug/ml. Segundo COLE & ELKAN (1979) o nível médio de resistência à essa droga, de um modo geral, oscila entre 10 e 20 ug/ml, podendo, ocasionalmente, ocorrer estirpes resistentes a níveis superiores. Contudo, neste estudo, apenas 4 das 151 estirpes estudadas (CM 201, CM 208, CM 231 e CM 235), foram resistentes às concentrações superiores a 20 ug/ml. Esse resultado, de um modo geral, é excepcional, mesmo considerando os resultados obtidos por SCOTTI et alii (1982) de que é comum estirpes de *Rhizobium*, isoladas de solos dos Cerrados do Brasil, resistirem a concentrações de 80 ug/ml dessa droga. Das 4 estirpes resistentes a níveis superiores a 20 ug/ml de estreptomicina, 3 (CM 201, CM 231 e CM 235) resistiram à concentração, extremamente elevada, de 640 ug/ml (Tabela 8).

As drogas espectinomicina e neomicina, pertencentes ao mesmo grupo da estreptomicina (Aminoglicosídeos), a exemplo desta e da tetraciclina, foram também letais, para um considerável número de estirpes, com a menor concentração testada (10 ug/ml). Entretanto, a

espectinomomicina, além de apresentar uma concentração mínima inibitória mais baixa do que a neomicina, também apresentou uma menor amplitude na concentração letal (Tabela 9).

A kazugamicina foi a droga que proporcionou a menor sensibilidade aos isolados testados. A exceção de uma estirpe, todas as demais foram resistentes à concentrações de até 320 ug/ml e 70 estirpes, ou seja, 46 % do total, toleraram a concentração máxima estudada de 640 ug/ml.

Tabela 9. Concentrações mínimas inibitórias e amplitudes dos níveis de sensibilidade de 7 antibióticos a 151 estirpes de *Rhizobium leguminosarum*

Antibiótico	Concentração mínima inibitória média (ug/ml)	Amplitude do nível de sensibilidade (ug/ml)
Estreptomomicina	15	0 - 640
Espectinomomicina	38	0 - 320
Tetraciclina	75	0 - 640
Neomicina	79	0 - 640
Rifampicina	115	10 - 320
Cloranfenicol	301	10 - 640
Kazugamicina	469	160 - 640

A resistência intrínseca, ou natural, de bactérias do gênero *Rhizobium*, de maneira geral, é

relativamente baixa para a droga tetraciclina (<25 ug/ml) e relativamente alta para o cloranfenicol (< 300 ug/ml), segundo os autores COLE & ELKAN, 1979, HAGEDORN, 1979 e JOSEY et alii, 1979). Em média, a concentração mínima inibitória, obtida para a droga cloranfenicol (301 ug/ml), praticamente, coincidiu com as informações apresentadas na literatura, contudo para a tetraciclina, esse valor foi bem mais elevado (75 ug/ml) (Tabela 9). Para a tetraciclina foram observadas estirpes tolerantes à concentrações desde 10 ug/ml até 640 ug/ml, sendo que 7 estirpes toleraram o nível máximo testado de 640 ug/ml. Quanto ao antibiótico cloranfenicol foi observado que todas as estirpes testadas toleraram concentrações mínimas de 10 ug/ml e que 48 estirpes, isto é, 30 % do total, toleraram a concentração máxima testada de 640 ug/ml. Os níveis de resistência encontrados para os antibióticos tetraciclina e cloranfenicol podem ser considerados semelhantes aos citados na literatura, porém, com algumas estirpes, extremamente resistentes a estas drogas. O isolamento de estirpes de *Rhizobium* tolerantes à concentrações desses antibióticos mais elevadas do que aquelas descritas na literatura, também foram citadas por SCOTTI et alii (1982) e SCOTTI (1988).

Para o antibiótico rifampicina, a exemplo do cloranfenicol, 100 % das estirpes testadas resistiram à

concentração mínima de 10 ug/ml, e a exemplo da espectinomicina, não houve estirpe resistente ao nível máximo de 640 ug/ml.

A exemplo do observado para a tolerância dos isolados aos fatores de acidez, não se observou relação entre o potencial de fixação simbiótica de nitrogênio, avaliado por meio da ARA, e a resistência aos antibióticos testados (Tabela 10). De modo indiferente, estirpes com elevados valores para a ARA, ou mesmo, estirpes não infectivas, apresentaram níveis variados de resistência aos antibióticos testados.

O antibiótico espectinomicina foi o mais letal para as estirpes com atividade da nitrogenase maior do que a testemunha. Apenas 6 isolados desses 40 mostraram-se resistentes à concentração mínima inibitória média observada para essa droga (38 ug/ml). Quanto ao antibiótico estreptomina, o qual foi o mais letal para o conjunto das 151 estirpes testadas, tendo apenas 20 estirpes resistentes a menor concentração testada, foi observado que 14 desses isolados resistentes, isto é, 70 %, permaneceram entre as 40 estirpes que apresentaram valores para a ARA maiores do que a testemunha. Dentre esses isolados, com elevada ARA e resistência à estreptomina, pode-se destacar as estirpes CM 201 e CM 231 que resistiram ao nível de 640 ug/ml, sendo tolerantes ao pH 4,5 e ao

pH 4,5 + 100 uM de alumínio, e também a estirpe CM 208 que resistiu a 160 ug/ml dessa droga, mas não tolerou aos fatores de acidez (Tabela 10).

A kazugamicina, a semelhança do ocorrido para com o grupo total das estirpes estudadas, não apresentou limitações para nenhuma das 40 estirpes com valores da ARA maior do que a testemunha, observando-se que 100 % delas resistiram à concentração de 320 ug/ml (Tabela 10).

Quanto as drogas neomicina e cloranfenicol, observou-se que mais de 50 % das 40 estirpes, com elevados valores para a atividade da nitrogenase, mostraram-se resistentes às concentrações mínimas inibitórias médias observadas para esses antibióticos os quais foram, 79 ug/ml e 301 ug/ml, respectivamente.

Aproximadamente, 45 % das estirpes, com valores para a ARA superiores a testemunha, resistiram à concentração mínima inibitória média de 25 ug/ml de tetraciclina. Dentre as 7 estirpes resistentes à elevada concentração de 640 ug/ml desse antibiótico, 4 pertencem a amostra de solo coletada, no município de Tatuí-SP (Tabela 1), autenticadas como CM 202, CM 203, CM 204 e CM 205, as quais mostraram-se tolerantes aos fatores de acidez e com atividade da nitrogenase superior a testemunha (Tabela 10).

O antibiótico rifampicina, com uma

Tabela 10. Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* com atividade da nitrogenase superior a testemunha CM 02, com seus níveis de tolerância à acidez e resistência a antibióticos

Isolado	Atividade total Nitrogenase	Tolerância		Nível máximo de resistência a antibióticos						
		pH 4,5	pH 4,5+A1	Estrep.	Cloranf.	Espect.	Kazuga.	Rifamp.	Tetrac.	Neomic.
	uM C ₂ H ₄ /plt.h						ug/ml			
CM 322	42,35	+	+	0	160	20	320	40	160	20
CM 206	41,85	+	+	0	160	0	320	80	10	160
CM 209	31,81	-	-	0	640	10	320	160	160	640
CM 208	29,80	-	-	160	80	10	320	160	80	320
CM 325	28,13	+	+	0	80	10	320	80	160	0
CM 213	24,61	+	+	10	80	20	640	10	10	80
CM 298	23,66	+	-	10	40	20	320	80	40	40
CM 202	23,44	+	+	20	640	20	640	40	640	40
CM 205	23,44	+	+	20	640	10	640	80	640	320
CM 201	23,44	+	+	640	640	40	320	80	80	640
CM 350	20,98	+	+	0	80	10	320	160	20	80
CM 234	19,08	-	-	0	160	20	320	320	10	20
CM 210	18,42	-	-	20	160	10	320	160	320	80
CM 233	18,42	-	-	0	320	160	320	320	20	160
CM 232	17,80	-	-	0	160	160	320	160	20	160
CM 297	17,41	+	-	0	40	20	320	80	40	40
CM 204	17,20	+	+	10	640	40	640	80	640	80
CM 212	17,19	+	+	0	80	10	320	10	10	40
CM 203	16,32	+	+	10	640	40	640	80	640	160
CM 324	16,25	+	+	0	80	20	320	80	10	0
CM 216	15,97	+	+	0	40	10	640	80	10	160
CM 351	14,73	+	+	10	160	10	640	320	20	40
CM 211	13,84	+	+	0	80	20	640	10	80	40
CM 217	13,75	+	+	10	40	10	320	160	10	80
CM 222	13,15	+	+	0	640	0	320	10	10	80
CM 214	13,06	+	+	0	80	20	320	10	10	80
CM 300	12,72	+	-	0	40	20	320	160	40	80
CM 273	12,72	+	+	0	160	10	320	160	20	80
CM 348	11,61	+	+	0	160	10	320	80	80	20
CM 223	11,25	+	+	0	320	0	640	80	20	80
CM 282	10,98	+	+	0	640	10	640	80	10	40
CM 231	10,44	+	+	640	10	80	320	320	0	80
CM 281	8,86	-	-	0	640	10	640	40	10	20
CM 229	8,84	+	+	0	40	20	320	80	20	160
CM 207	8,71	-	-	0	640	10	640	80	320	160
CM 310	8,71	+	-	0	160	20	320	160	20	10
CM 347	8,37	+	+	10	80	10	320	160	40	20
CM 215	8,09	+	+	0	40	20	640	10	10	80
CM 296	8,04	+	+	20	640	10	320	80	20	40
CM 321	7,97	+	+	0	80	0	320	80	80	10
CM 02	7,95	+	+	*	*	*	*	*	*	*

*+ ou *- = Formação, ou não, de colônias isoladas em placas, com 4 dias de incubação a 28 C

concentração mínima inibitória média de 115 ug/ml, foi tolerado por apenas 35 % das 40 estirpes com elevada ARA.

Dessas observações é possível destacar, entre as 40 estirpes com valores da ARA superiores a testemunha, 13 isolados com resistência a todos os antibióticos testados, pelo menos para a menor concentração utilizada, sendo que 10 destes, com tolerância aos fatores de acidez (CM 213, CM 202, CM 205, CM 201, CM 204, CM 203, CM 351, CM 217, CM 347 e CM 296). As estirpes CM 208, CM 210 e CM 298, não toleraram a fatores de acidez, contudo constituem-se em materiais importantes para solos corrigidos, os quais apresentam atividade biológica normalmente mais intensa do que os solos ácidos especialmente com actinomicetos, microorganismos estes, segundo DAMIRGI & JOHNSON (1966) e KOSSLAK & BOHLOOL (1985), responsáveis pela produção de substâncias antibióticas capazes de levar ao insucesso a prática de inoculação (SCOTTI et alii, 1982).

4.6. Habilidade de estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, isoladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, em infectar raízes de *Leucaena leucocephala*

Os resultados dos testes de habilidade de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, isoladas

de nódulos produzidos por plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), em infectar plantas de *Leucaena leucocephala*, bem como, de seu potencial em fixar nitrogênio atmosférico, estão discriminados na Tabela 11.

Do total das 140 estirpes testadas para esses comportamentos, 106, isto é, 76 %, apresentaram habilidade infectiva e 99 destas, ou seja, 93 %, foram eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico. Dentre as estirpes que se mostraram infectivas, às plantas de *Leucaena*, e apresentaram potencial para fixação de nitrogênio atmosférico, 57 foram tolerantes aos fatores de acidez, pH 4,5 e pH 4,5 + 100 μ M de alumínio, 22 toleraram apenas o fator pH 4,5, e 20 foram sensíveis à acidez (Tabela 12).

Dentre as 40 estirpes, com atividade de redução de acetileno maior do que a testemunha, 38 foram testadas para infectividade de plantas de *Leucaena*, obtendo-se desses testes 33 isolados, 87 %, com habilidade infectiva e potencial para fixação de nitrogênio atmosférico.

Segundo MARTINEZ et alii (1988) as estirpes de *Rhizobium* do tipo II, isto é, rizóbios do feijoeiro com habilidade de infectar leguminosas de outros gêneros, apresentam uma maior estabilidade genética do que aquelas do tipo I, específicas para *Phaseolus vulgaris*. Se

Tabela 11. Habilidade de isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em infectar e fixar nitrogênio atmosférico em plantas de *Leucaena leucocephala*

Isolado	Nodula	Fixa	Isolado	Nodula	Fixa	Isolado	Nodula	Fixa	Isolado	Nodula	Fixa
CM 201	+	+	CM 238	+	+	CM 274	+	+	CM 313	+	+
CM 202	+	+	CM 239	+	-	CM 275	+	+	CM 314	+	+
CM 203	+	+	CM 240	-	-	CM 276	+	+	CM 315	+	+
CM 204	+	+	CM 241	-	-	CM 277	+	+	CM 316	+	+
CM 205	+	+	CM 242	+	+	CM 278	-	-	CM 317	+	+
CM 207	+	+	CM 243	+	-	CM 279	-	-	CM 318	+	+
CM 208	-	-	CM 244	-	-	CM 280	-	-	CM 319	+	+
CM 209	-	-	CM 245	+	-	CM 281	+	+	CM 320	+	+
CM 210	+	+	CM 246	-	-	CM 282	-	-	CM 321	+	+
CM 211	+	+	CM 247	-	-	CM 283	+	+	CM 323	+	+
CM 212	+	+	CM 248	+	-	CM 284	-	-	CM 324	-	-
CM 213	+	+	CM 249	+	-	CM 286	+	+	CM 325	+	+
CM 214	+	+	CM 250	+	+	CM 287	-	-	CM 326	+	+
CM 215	+	+	CM 251	+	+	CM 288	-	-	CM 327	+	+
CM 216	+	+	CM 252	+	+	CM 289	-	-	CM 328	+	+
CM 217	+	+	CM 253	+	+	CM 290	+	+	CM 329	+	+
CM 218	+	+	CM 254	+	+	CM 291	+	-	CM 331	+	+
CM 219	+	+	CM 255	+	+	CM 292	+	+	CM 332	+	+
CM 220	-	-	CM 256	-	-	CM 293	+	+	CM 333	+	+
CM 221	+	+	CM 257	+	+	CM 294	+	+	CM 334	-	-
CM 222	+	+	CM 258	+	+	CM 295	+	-	CM 335	-	-
CM 223	+	+	CM 259	-	-	CM 296	+	+	CM 336	+	+
CM 224	+	+	CM 260	+	+	CM 297	+	+	CM 337	+	+
CM 225	+	+	CM 261	+	+	CM 298	+	+	CM 338	-	-
CM 227	-	-	CM 262	-	-	CM 299	+	+	CM 339	+	+
CM 228	-	-	CM 264	-	-	CM 300	+	+	CM 340	+	+
CM 229	+	+	CM 265	-	-	CM 301	-	-	CM 341	+	+
CM 230	+	+	CM 266	+	+	CM 302	-	-	CM 342	+	+
CM 231	+	+	CM 267	+	+	CM 303	+	+	CM 345	+	+
CM 232	+	+	CM 268	-	-	CM 304	+	+	CM 346	+	+
CM 233	-	-	CM 269	+	+	CM 306	+	+	CM 347	+	+
CM 234	+	+	CM 270	-	-	CM 309	+	+	CM 348	+	+
CM 235	-	-	CM 271	+	+	CM 310	+	+	CM 349	+	+
CM 236	-	-	CM 272	+	+	CM 311	+	+	CM 350	+	+
CM 237	+	+	CM 273	+	+	CM 312	+	+	CM 351	+	+

"+" ou "-" Formação, ou não, de nódulos em raízes de leucena e fixação, ou não, de nitrogênio do ar

confirmada essa afirmativa, seria de grande importância esse tipo de classificação para os isolados destinados a produção de inoculantes, uma vez que se reduziria os riscos de perda das propriedades para as quais as estirpes foram selecionadas.

Tabela 12. Relação entre a habilidade de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* infectar *Leucaena* e seus potenciais em tolerar fatores de acidez e fixar nitrogênio atmosférico nesta leguminosa

Número de isolados	Nodulação em <i>Leucaena leucocephala</i>	Fixação de nitrogênio do ar	Tolerância a acidez	
			pH 4,5	pH 4,5 + 100 uM
57	+	+	+	+
22	+	+	+	-
20	+	+	-	-
4	+	-	+	+
1	+	-	+	-
2	+	-	-	-
13	-	-	+	+
4	-	-	+	-
17	-	-	-	-

"+" ou "-" Formação, ou não de nódulos, fixação, ou não de nitrogênio atmosférico e tolerância, ou não aos fatores de acidez

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- parte das estirpes, isoladas, purificadas e autenticadas como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* apresentaram eficiência simbiótica, tolerância aos fatores de acidez e resistência a antibióticos;

- as estirpes autenticadas como CM 201, CM 202, CM 203, CM 204, CM 205, CM 213, CM 217, CM 296, CM 347 e CM 351 apresentaram atividade da nitrogenase superior a testemunha CM 02 (CIAT 899), toleraram aos fatores de acidez e resistiram a todos os antibióticos;

- as estirpes CM 322 e CM 206 destacaram-se das demais por apresentar as mais elevadas atividades da nitrogenase (42,35 e 41,85 μM de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$), sendo cerca de 10 μM de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$ superior a terceira estirpe mais ativa e 35 μM de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{planta.h}$ superior a testemunha CM 02 (CIAT 899);

- das 151 estirpes de *Rhizobium*

leguminosarum bv. *phaseoli* isoladas 73 % mostraram-se tolerantes ao pH 4,5 e 52 % tolerantes ao pH 4,5 acrescido de 100 uM de alumínio;

- 106 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mostraram-se hábeis para infectar plantas de *Leucaena leucocephala* e 99 destas apresentaram eficiência para a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico;

- o trabalho permitiu a formação de um banco de germoplasma o qual poderá viabilizar em estudos futuros a produção de inoculantes constituídos por estirpes de *Rhizobium* com características genéticas mais estáveis, especialmente para solos com problemas de acidez e toxidez de alumínio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYANABA, A.; ASANUMA, S.; MUNNS, D. N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminum stress. Soil Sci. Am. J., 47:256-259, 1983.
- BAUER, W. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol., 32:407-449, 1981.
- BECK, D. P. & MUNNS, D. N. Effect of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. Soil Sci. Soc. Am. J., 49:334-337, 1985.
- BECK, D. P. & MUNNS, D. N. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. Appl. Environ. Microbiol., 47(2):278-282, 1984.
- BERGERSEN, F.J. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. Aust. J. Biol. Sci., 14(3):349-360, 1961.
- BHANDARI, B. & NICHOLAS, D. J. D. Proton motive force in washed cells of *Rhizobium japonicum* and bacteroids from *Glycine max*. J. Bacteriol., 164(3):1383-1385, 1985.
- BHUVANESWARI, T. V. & BAUER, W. D. Role of lectins in plant microorganism interactions. Plant Physiol., 62:71-74, 1978.
- BHUVANESWARI, T. V. & SOLHEIM, B. Root hair deformation in white clover - *Rhizobium trifolii* symbiosis. Physiol. Plant., 63:25-34, 1985.
- BHUVANESWARI, T.V.; TURGEON, B.G.; BAUER, W.D. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. Plant Physiol., 66:1027-1031, 1980.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Immunofluorescent polar tips

- of *Rhizobium japonicum*: possible site of attachment for lectin binding. J. Bacteriol., 125(3):1188-1194, 1976.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium* - legume root nodule symbiosis. Science, New York, 185:269-271, 1974.
- BOHLOOL, B. B. & SCHMIDT, E. L. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. Soil Sci. Soc. Am. J., 73:561-564, 1973.
- BOWRA, B.J. & DILWORTH, M.J. Motility and chemotaxis toward sugars in *Rhizobium leguminosarum*. Gen. Microbiol., 126:231-235, 1981.
- BRADLEY, T. J. & PARKER, M. S. Binding of aluminium ions by *Staphylococcus aureus* 893. Experientia, 24:1175-1176, 1968.
- BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E. A.; GAULT, R. R. 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 Biol. Biochem., Oxford, 9:19-24, 1977.
- BROMFIELD, E.S.P. & JONES, D.G. Studies on acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture and soil. J. Appl. Bacteriol. 48:253-264, 1980.
- BROUGHTON, W. J. Control of specificity in legume-*Rhizobium* associations. J. Appl. Bact., London, 45:165-194, 1978.
- CALLAHAM, D. A. & TORREY, J. G. The structural basis for infection of root hairs *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can. J. Bot., 59:1647-1664, 1981.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N.; BECK, D.P. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum*: strain differences in phosphate storage and utilization. Soil Sci. Soc. Am. J., 45:517-520, 1981.
- COLE, M.A. & ELKAN, G.H. Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 37:867-870, 1979.
- CUNNINGHAM, S. D. & MUNNS, D. N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminum

- activity. Soil Sci. Soc. Am. J., 48:1276-1280, 1984.
- GUNNINGHAM, S. D. & MUNNS, D. N. Effect of rhizobial extra-cellular polysaccharide on solution phosphate levels of acid soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 49:609-612, 1985.
- DAMIRGI, S.M. & JOHNSON, H.W. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*, Agron. J., 58:223-224, 1986.
- DART, P. J. Development of root-nodule symbiosis. 1. The infection process. In: QUISPEL, A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam. 1974. Cap. 11, p.381-429.
- DATE, R. A. & HALLIDAY, J. Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. Nature, 277:62-64, 1979.
- DAZZO, F. B. The mechanism of recognition between legume roots and rhizobia: some implications for biological nitrogen fixation in the tropics. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali. 1982. p.93-103.
- DAZZO, F. B. & HUBBELL, D. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium* - clover association. Appl. Microbiol., 30(6):1017-1033, 1975.
- DAZZO, F. B.; NAPOLI, C. A.; HUBBELL, D. H. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium* - clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 32(1):166-171, 1976.
- DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.; ABE, M.; PANKRATZ, S. H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolium* - clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 48(6):1140-1150, 1984.
- DOBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. Plant Soil, 14:153-166, 1966.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. Plant and Soil, 88:333-343, 1985.

- EL-HALOUI, N. E.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R. Infection competitiveness between *Rhizobium meliloti* strains: role of mobility. Plant and Soil, 95:337-341, 1986.
- FRANCO, A. A. & DOBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. Pesq. Agropec. Bras., Rio de Janeiro, 2:467-474, 1967.
- FRENEY, J. R. & GIBSON, A. H. Non-protein nitrogen accumulation in legume nodules. Mechan. Regul. Plant Growth Bull., Wellington, (12):37-40, 1974.
- GOBER, J. M. & KASHKET, E. R. Effects of K^+ on the proton motive force of *Bradyrhizobium* sp. strain 32H1. J. Bacteriol., 166(2):618-622, 1986.
- GOTZ, R.; LIMMER, N.; OBER, K.; SCHMIDT, R. Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. J. Gen. Microbiol., 128:789-798, 1982.
- GRAHAM, P. H. Some problemas of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* (L.): a review. Field Crops Res., 4:93-112, 1981.
- GRAHAM, P. H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: J.M. VINCENT et alii. Exploiting the legume - *Rhizobium* symbiosis in Tropical agriculture. Univ. of Hawaii. 1977. p.313-334.
- GRAHAM, P. H. & PARKER, C. A. Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and Soil, 20:383-396, 1964.
- GRAHAM, P. H. & ROSAS, J. C. Growth and development of indeterminate and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. J. Agric. Sci. Camb., 88:503-508, 1977.
- GRAHAM, P. H.; VITERI, S. E.; MACKIE, F.; VARGAS, A. T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. Field Crops Research, 5:121-128, 1982.
- HAGEDORN, C. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* population. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 43:921-925, 1979.
- HERNANDES, B. S. & FOCHT, D. Invalidity of the concept of

- slow growth and alkali production in cowpea rhizobia. Appl. Environ. Microbiol., 48(1):206-210, 1984.
- HOLDING, A. J. & KING, J. The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* relation to soil factors. Plant and Soil, 18:191-198, 1963.
- HOWIESON, J. G. Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. Plant and Soil, 88:367-376, 1985.
- HOWIESON, J. G. & EWING, M. A. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti* - Medicago symbiosis. Aust. J. Agric. Res., 37:55-64, 1986.
- HUBBELL, D. H. Studies on the root hair curling factor of *Rhizobium*. Bot. Gaz., 131(4):337-342, 1970.
- HUMPHREY, B. & VINCENT, J. M. Calcium in cell walls of *Rhizobium trifolii*. J. Gen. Microbiol., 29:557-61, 1962.
- JOHNSON, H.W. & MEANS, V.M. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. Agron. J., Madison, 56:60-62, 1964.
- JOSEY, D.P.; BEYNON, J.L.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. J. Appl. Bacteriol., London, 46:343-350, 1979.
- KARLIK, S.J.; EICHHORN, G.L.; CRAPPER MCLACHLAN, D.R. Molecular interaction of aluminum with DNA. Neurotoxicology, 1:83-88, 1980.
- KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J., 43:519-523, 1979.
- KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol., 49(5):1128-1133, 1985.
- LEVIN, R. A. & MONTGOMERY, M. P. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. Plant Soil, The Hague, 41:669-676, 1974.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KIIHL, R.; IGUE, T. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de

- Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Bragantia, Campinas, 35(1):1-12, 1976a.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; OLIVEIRA, M.L.C. Especificidade de hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium phaseoli* para as cultivares Moruna, Carlota, Piratã e Golano-precoce de feijão (*Phaseolus vulgaris*). In: REUNIÃO LATINOAMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 8. Call, 1976. Anais... Call, CIAT, 1976b. p.24.
- LOWENDORF, H.S. & ALEXANDER, M. Identification of *Rhizobium phaseoli* strains that are tolerant or sensitive to soil acidity. Appl. Environ. Microbiol., 45:737-742, 1983.
- MACLAUGHLIN, W. & AHMAD, M. H. Intrinsic antibiotic resistance and streptomycin uptake in cowpea rhizobia. FEMS Microbiol. Letters, 21:289-303, 1984.
- MAGNAB, R. M. & KOSHLAND Jr., D. E. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 69(9):2509-2512, 1972.
- MEYER, M. C. & PUEPPKE, S. G. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strain derivatives by antibiotic sensitivity patterns, lectin binding, and utilization of biochemicals. Can. J. Microbiol., Ottawa, 26:806-812, 1980.
- MISRA, T. K.; SILVER, S.; MOBLEY, H. L. T.; ROSEN, B. P. Molecular genetics and biochemistry of heavy metal resistance in bacteria. In: TASHJIAN Jr., A.H. Molecular and cellular approaches to understanding mechanisms of toxicity. Boston, Harvard School of Public Health. 1983. p.63-87.
- MOAWAD, H. & BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium* spp. in two Tropical soils. Appl. Environ. Microbiol., 48(1):5-9, 1984.
- MORALES, V. M. & HUBBELL, D. H. Effect of pH on growth of cowpea type *Rhizobium* on synthetic medium. Soil and Crop Sci. Soc. of Florida. Proceedings, 38:83-86, 1979.
- MUNNS, D.N. Mineral nutrition and the legume symbiosis. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley. 1976. v.4, p.353-392.
- MUNNS, D.N. Soil acidity and nodulation. In: ANDREW, C.S. &

- KAMPRATH, E.S. Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils. Melbourne, CSIRO 1978. p.247-263.
- MUNNS, D.N. Mineral nutrition and the legume symbiosis. In: HARDY & GIBSON. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley. 1977a. Section 4. p.353-391.
- MUNNS, D. N. Soil acidity and related factors. In: VINCENT, J.M. Exploiting the legume - *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii, College of agriculture, 1977b. p.211-236. (Misc. Publ., 145).
- MUNNS, D.N. & KEYSER, H.H. Response of *Rhizobium* strains to acid and aluminum stress. Soil Biol. Biochem., 13:115-118, 1981.
- NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium*: a unifying concept. Plant and Soil, 22(2):143-166, 1965.
- NORRIS, D. O. & DATE, R. A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H. & BRYAN, W.W. ED. Tropical pasture research - principles and methods. Hurley, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976. p.134-74. (Bulletin, 51)
- NUTMAN, P. S. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover. Aust. J. Agric. Res., Melbourne, 18:381-425, 1967.
- PESSANHA, G.G.; FRANCO, A.A.; DOBEREINER, J.; GROSZMANN, A.; BRITO, D.P.P.S. Negative correlation of nodulation and grain production of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils where nitrogen is not limiting factor of plant growth. Pess. Agropec. bras., Rio de Janeiro, 7:49-58, 1972.
- PETTERSSON, A.; HALLBOM, L.; BERGMAN, B. Physiological and structural responses of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to aluminum. Physiol. Plant., 63:153-158, 1985a.
- PETTERSSON, A.; KUNST, L.; BERGMAN, B.; ROOMANS, G.M. Accumulation of aluminum by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. Gen. Microbiol., 131:2545-2548, 1985b.
- PETTERSSON, A.; HALLBOM, L.; BERGMAN, B. Aluminium uptake by *Anabaena cylindrica*. J. Gen. Microbiol., 132:1771-1774, 1986.

- PORTUGAL, V.O. Comportamiento ecológico de las cepas nativas de *Rhizobium meliloti*. México, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, 1986. 127p. (Tase de Doutorado).
- PUEPPKE, S. G.; BAUER, W. D.; KEEGSTRA, K.; FERGUSON, A. L. Role of lectins in plant-microorganism interactions. II. Distribution of soybean lectin in tissues of *Glycine max* (L.) Merrill. Plant Physiol., Rockville, **61**:779-784, 1978.
- RAIJ, B.V.; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S.; BATAGLIA, O.C. Análise química do solo para fins de fertilidade. Campinas, Fundação Cargill, 1987. 170p.
- RICE, W. A. & OLSEN, P. E. Inoculation of alfalfa seed for increase yield on moderately acid soil. Can. J. Soil Sci., **63**:541-545, 1983.
- ROBSON, A. D. & LONERAGAN, J. F. Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. I. Effect of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of *Medicago truncatula* on a moderately acid soil. Aust. J. Agric. Res., **21**:427-434, 1970.
- ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DAVILA, G. Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol., **54**(3):8-10, 1988.
- ROTH, L. E.; DUNLAP, J. R.; STACEY, G. Localizations of aluminum in soybean bacteroids and seeds. Appl. Environ. Microbiol., **53**(10):2548-2553, 1987.
- ROUGHLEY, R.J.; BLOWES, W.M.; HERRIDGE, D.F. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobia in competition with naturalized strains. Soil Biol. Biochem., Oxford, **8**:403-407, 1980.
- ROVIRA, A.D. Plant root exudates. Bot. Rev., New York, **35**:35-37, 1969.
- RUSCHEL, A.P. & SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris*). R. bras. Ci. Solo, **1**:21-24, 1977.

- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of N_2 fixation and N-utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. Plant and Soil, 65:397-407, 1982.
- SCHMIDT, E. L. Initiation of plant root microbe interactions. Ann. Rev. Microbiol., 33:355-376, 1979.
- SCHWINGHAMER, E. A. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. In: HARDY, W.F. & SILVER, W.S. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley. 1977. v.3, p.577-622.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SA, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DOBEREINER, J. Susceptibility of *Rhizobium* strains to antibiotics: a possible reason for legume inoculation failure Cerrado soils. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. Biological nitrogen fixation technology for Tropical Agriculture. Call, CIAT, 1981. (Proceedings)... Call, CIAT, 1982. p.195-200.
- SINCLAIR, M.J. & EAGLESHAM, R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relations to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. Soil Biol. Biochem., Oxford, 16:247-251, 1984.
- SIROVER, M. A. & LOEB, L. A. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. Science, 194:1434-1436, 1976.
- SKOTNICKI, M.L. & ROLFE, B.G. Differential stimulation and inhibition of growth of *Rhizobium trifolii* strain T1 and other *Rhizobium* species by various carbon sources. Microbios, 20:15-28, 1977.
- SOUZA, L.A.G.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. Evaluation of the growth of *Rhizobium* leguminous forest tree on different culture media. Pesq. agropec. bras., 19:165-168, 1984.
- SUTTON, W.D. & PATTERSON, A.D. Further evidence for a plant host effect on *Rhizobium* bacteroid viability. Plant Sci. Letters, 30:33-41, 1983.
- THORNTON, F. C. & DAVEY, C. B. Acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture media. Soil Sci. Soc. Am. J., 47:496-501, 1983a.
- THORNTON, F. C. & DAVEY, C. B. Response of the clover -

- Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. Agron. J., 75:557-560, 1983b.
- TREMBLAY, P. A. & MILLER, R. W. Cytoplasmic membrane of *Rhizobium meliloti* bacteroids. II. Functional differentiation and generation of membrane potentials. Can. J. Biochem. Cell Biol., 62:592-600, 1984.
- TURCO, R.F.; MOORMAN, T.B.; BEZDICEK, D.F. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem., 18(3):259-262, 1986.
- VAN SCHREVEN, D. A. On the resistance of effectiveness of *Rhizobium trifolii* to a low pH. Plant and Soil, 37:49-55, 1972.
- VARGAS, A.A.T. & GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. Plant and Soil, 117:195-200, 1989.
- VARGAS, A. A. T. & GRAHAM, P. H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. Field Crops Research, Amsterdam, 19:91-101, 1988.
- VARGAS, A.A.T.; SANTOS, A.F.; PACOVA, B.E.V.; SILVEIRA, J.S. Fixação simbiótica do nitrogênio no feijoeiro. III. Seleção de cultivares para alta eficiência na fixação do N₂ e resistência a antracnose no Espírito Santo. Vitória, EMCAPA, 1983. 6p. (Com. técnico, 17).
- VETTORI, L. Métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim técnico, 7).
- VIERSTRA, R. & HAUG, A. The effect of Al³⁺ on the physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum*. Biochem. Biophys. Research Comm., 84(1):138-143, 1978.
- VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. London, Burgess, IBP, 1970. 164p.
- VINCENT, J. M. Environment factors in the fixation of nitrogen by the legume. In: BARTHOLOMEW, W.V. & CLARK, F.E. Soil nitrogen. Agronomy, 10:384-435, 1965.
- VINCENT, J. M. Factors controlling the legume - *Rhizobium*

- symbiosis. In: NEWTON, W.E. & ORNE-JOHNSON, W.H. Nitrogen fixation. Baltimore, Vol. 2, p.103-129. 1980.
- VINCENT, J. M. *Rhizobium*, general microbiology. In: HARDY, R.W.F. & SILVER, W.S. A treatise on dinitrogen fixation: biology. New York, John Willey. 1977. v.3, p.277-366.
- VINCENT, J. M. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: QUISPÉL, A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam. 1974. p.265-341.
- VIOLA, R.E.; MORRISON, J.F.; CLELAND, W.W. Interaction of metal III-Adenosine 5-triphosphate complexes with yeast hexokinase. Biochemistry, 19:3131-3137, 1980.
- WEAVER, R. W. & FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. II. Field studies. Agron. J., Madison, 66:233-236, 1974.
- WOLPERT, J. S. & ALBERSHEIM, P. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 70:729-737, 1976.
- WOOD, M. & COOPER, J. E. Aluminium toxicity and multiplication of *Rhizobium trifolii* in a defined growth medium. Soil Biol. Biochem., 16(6):571-576, 1984.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminum. Soil Biol. Biochem., 17(4):493-497, 1985.
- YANZHEN, C. & JUNCHU, Z. Differentiation and viability of nodule bacteria in host cells. Sci. Sinica, 27(6):593-600, 1984.
- YAO, P.Y. & VINCENT, J.M. Host specificity in the root hair curling factor of *Rhizobium* spp. Aust. J. Bio. Sci., 22:413-423, 1969.
- ZABLOTOWICZ, R. M. & FOCHT, D. D. Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. Environ. Microbiol., 41:678-685, 1981.

APÉNDICES

Apêndice 1. Solução nutritiva elaborada por Mc Knight

Solução Estoque D:

FeCl ₃ (Sol. 4g FeCl ₃ /l)	16,80 ml
EDTA Na.2H ₂ O	2,00 g
Água destilada, deionizada	1.000,00 ml

Solução Estoque A - Z:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
H ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,09 g
Água destilada, deionizada	1.000,00 ml

Solução Completa:

CaSO ₄ .2H ₂ O	37,93 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g
KH ₂ PO ₄	4,00 g
KCl	7,50 g
Solução A - Z	25,00 ml
Solução D	25,00 ml
NaOH 1N	17,50 ml
Água destilada, deionizada	1.175,00 ml
Diluir em 20 litros de água destilada, deionizada	

Apêndice 2. Solução nutritiva elaborada por Hoagland

Solução de Micronutrientes:

H_3BO_3	2,86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g
H_2MoO_4	0,02 g
Água destilada, deionizada	q.s.p. 1.000 ml

Solução Completa:

K_2SO_4 0,5 M	4,0 ml
K_2HPO_4 1,0 M	1,0 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,0 M	3,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 M	0,5 ml
Fe-EDTA (Sol. 10 mM)	1,0 ml
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Sol. 1g/l)	2,0 ml
Solução de micronutrientes	1,0 ml
Água destilada, deionizada	q.s.p. 1.000,0 ml
Ajustar para pH = 6,0 com H_2SO_4	