

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Caracterização de Bactérias Nativas de Solos do
Semiárido Brasileiro Isoladas de Nódulos de
Feijão-caupi**

Jakson Leite

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS NATIVAS DE SOLOS DO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO ISOLADAS DE NÓDULOS DE
FEIJÃO-CAUPI**

JAKSON LEITE

Sob a Orientação do Pesquisador
Gustavo Ribeiro Xavier

e Co-orientação da Pesquisadora
Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência** em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

631.46981
L533c
T

Leite, Jakson, 1984-
Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão - caupi / Jakson Leite - 2011.

51f. : il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: p.36-44.

1. Microorganismos do solo - Brasil - Teses. 2. Caatinga - Teses. 3. Rizóbio - Teses. 4. Feijão - de - corda - Teses I. Xavier, Gustavo Ribeiro, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIAS DO SOLO**

JAKSON LEITE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 /02/2011

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ

Lindete Miria Vieira Martins. Dra. UNEB

DEDICATÓRIA

Toda a energia empregada na realização desta fase do meu “projeto de vida”
(noites estudando; finais de semana no laboratório; horas em frente ao
computador lendo, digitando e pesquisando),
dedico a Noralice Leite, minha mãe
e aos meus irmãos
Alexandre, Jorge e Taise Leite.

AGRADECIMENTOS

Acredito na ideia de que não se constrói nada só. Na vida os cúmplices são sempre necessários para realização de qualquer projeto. A eles dirijo meus agradecimentos:

Ao meu motivo, razão, sentido, objetivo, alvo, propósito, inspiração, guia, luz, caminho, pelo Qual, por meio do Qual e a Quem dedico minha existência e o sopro de vida em mim: **Cristo Jesus**. Muito obrigado por mais uma etapa vencida, pois sei que *“tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu”*. (Ec 3.1)

À minha mãe, Noralice Leite, que me apoiou e acreditou na minha força. E aos meus irmãos que provaram seu laço de sangue quando mais precisei deles me dando suporte para poder crescer.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao CPGA-CS pela oportunidade de poder fazer o curso.

Aos secretários do CPGA-CS pela paciência de “Jó” com qual sempre me atenderam nas inúmeras vezes que ia à secretaria para “pegar e/ou entregar papel”.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Dr. Gustavo Ribeiro Xavier, meu orientador, pela confiança e por ter me aceitado no grupo de trabalho que coordena. A Dra. Norma Gouveia Rumjanek por ter aceitado integrar o comitê de orientação como Co-orientadora.

À Dra. Viviane Radl pela imensurável contribuição prestada durante os trabalhos desenvolvidos. Posso considerar você como uma dos maiores cúmplices desta história.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana: Andréa, Anelise, Beatriz, Carlos Vergara, Débora, Elson, Fernanda, Guilherme, Samuel, Silvana, Sumaya e Vinícius. E sem esquecer ela que é meu melhor alvo de ‘resenha’: Claudia Alexandrino, a Claudinha (valente!).

À secretária do Laboratório de Ecologia Microbiana, Rosana Muzzi, pelos serviços prestados que facilitaram muito minha vida no laboratório.

À Doutora (agora posso chamar assim) Rosa Mota pelas incansáveis conversas sobre feijão-caupi. Este assunto ainda vai longe. Espero (risos).

Ao senhor Aurélio e ao senhor Serginho pelo apoio nos ensaios montados na casa-de-vegetação.

Aos amigos do curso: Roselaine, Selenobaldo, Alessandro, Lenilson, Eloísa, Erica, Camila, Marcus Vinicius e Cássia, pelas “resenhas” de corredor, e aos amigos do alojamento da Embrapa Agrobiologia pelo convívio, festas de aniversário e “resenhas” na cozinha na hora do jantar. Tanto aos que saíram, assim como os que chegaram. Aqui me sinto em casa.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, fez parte desta jornada.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Jakson Leite, filho de Noralice Leite, nasceu em 12 de junho de 1984, na cidade de Itiúba, estado da Bahia. Em 2003 formou-se em Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Senhor do Bonfim, atual IFBaiano Campus Senhor do Bonfim. Em 2009, graduou-se em Bacharelado em Engenharia Agrônômica pela Universidade do Estado da Bahia. Durante a graduação teve seu primeiro contato com a pesquisa científica como bolsista de Iniciação Tecnológica e Industrial do CNPq participando de projetos na área de Microbiologia do Solo durante os anos de 2005 a 2009, orientador pela Dra Lindete Miria Vieira Martins. Em março de 2009, ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde desenvolveu, como bolsista da CAPES, sua dissertação “*Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi*”, no Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia sob a orientação do Dr. Gustavo Ribeiro Xavier, a qual defende na presente data.

RESUMO

LEITE, Jakson. **Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi**. 2011, 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A zona climática que caracteriza o semiárido brasileiro é ocupada por um bioma único do Brasil: a Caatinga. Este bioma pode guardar uma diversidade de organismos acima e abaixo do nível do solo ainda não conhecida, como por exemplo, o grupo de bactérias diazotróficas, importante recurso ambiental com potencial biotecnológico. Nesta região o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] está presente em áreas de pequenos agricultores e o nitrogênio necessário para seu o crescimento e produção pode ser obtido pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. O conhecimento da diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam o feijão-caupi, por meio da caracterização, é o passo inicial para a seleção de estirpes eficientes para a produção de inoculantes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi. Foram caracterizados um total de 189 isolados para tolerância ao estresse de alta temperatura e de concentração de NaCl em meio de cultura. Destes, foram selecionados 50 isolados para caracterização fenotípica por meio de testes de tolerância a pH, resistência intrínseca a antibióticos, utilização de fontes de carbono, testes enzimáticos e solubilização de fosfato de cálcio. Os mesmos isolados foram caracterizados genotipicamente utilizando o *primer* BOX 1A e foi determinada a variabilidade do tamanho do ITS (*Internally Transcribed Spacer*) entre os isolados. Os isolados mostraram variabilidade para os testes de temperatura e de concentração de NaCl em meio de cultivo, tendo sido obtidos 18 perfis de tolerância, sendo que o estresse provocado pelo NaCl foi mais nocivo ao crescimento dos isolados. Nenhum isolado de crescimento lento cresceu em pH 4. O teste de resistência a antibióticos mostrou 41 perfis distintos. O antibiótico cefotaxima foi o que mais limitou o crescimento dos isolados. Os isolados de crescimento rápido apresentaram menor índice de resistência múltipla, mostrando ser mais suscetíveis aos antibióticos. No entanto, os isolados de crescimento rápido foram mais versáteis para utilização de fontes de carbono e mostram maior variabilidade para atividade enzimática. Quatorze isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, todos de crescimento rápido. Os isolados de crescimento rápido mostraram maior variabilidade para o comprimento do ITS. O *primer* BOX gerou 43 perfis que foram agrupados em oito grupos genotípicos. Os isolados de crescimento rápido mostraram ser mais diversos.

Palavras-chave: Semiárido. Caatinga. Rizóbio. *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

LEITE, Jakson. **Characterization of native bacteria in soils of the semiarid Brazilian isolated from nodules of cowpea**. 2011. 51p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The climate zone that characterizes the semi-arid region is occupied by a single Brazilian biome: Caatinga. This biome can store a variety of organisms above and below ground level not yet known, for example the group of diazotrophic bacteria, an important environmental resource with potential for biotechnology. In this region, the cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is present in small farms and the nitrogen needed for growth and production can be obtained by biological nitrogen fixation process. Knowledge of diversity of diazotrophic bacteria nodulating cowpea, through characterization, is the initial step to select efficient strains for inoculant production. The objective of this study was to characterize phenotypic and genotypic bacteria native from soils of semi-arid region, isolated from nodules of cowpea. A total of 189 isolates were characterized in culture medium for stress tolerance from high temperature and NaCl concentration. From these, 50 isolates were selected for phenotypic characterization by testing pH tolerance, intrinsic resistance to antibiotics, use of carbon sources, enzyme tests, and solubilization of calcium phosphate. The same isolates were characterized genotypically using *primer* BOX 1A, and it was determined the variability of the size of ITS (*Internally Transcribed Spacer*) among isolates. The isolates showed variability for temperature and salt concentration tests in culture medium, where 18 profiles of tolerance were obtained, and the stress by NaCl was more harmful to isolates growth. None of the slow growth isolates grew at pH 4. The antibiotic resistance test showed 41 distinct profiles. The antibiotic cefotaxime was the most limiting to the isolates growth. Isolates with fast growth rate showed the lowest multiple resistance indexes, proving to be more susceptible to antibiotics. However, fast-growing isolates were most versatile in the usage of carbon sources and showed greatest variability in enzyme activity. Fourteen isolates were able to solubilize calcium phosphate, all fast-growing types. The fast growing isolates showed greatest variability for ITS length. The BOX *primer* generated 43 profiles that were grouped into eight genotypic groups. The strains of rapid growth proved to be more diverse.

Key words: Semi-arid. Caatinga. Rhizobia. *Vigna unguiculata*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Frequência de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto à tolerância ao estresse de temperatura e concentração de NaCl. A – Frequências relativas à avaliação de 189 isolados. B – Frequências relativas à avaliação de 111 isolados de crescimento rápido (barras pretas) e de 78 isolados de crescimento lento (barras cinzas). Usar esse modelo em todas as legendas de figuras e tabelas. 15
- Figura 2.** Perfis de tolerância a estresse abiótico de temperatura (39, 41, 43 e 45°C) e a concentrações de NaCl (1, 2, 3 e 4%) de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi nativas de solos do semiárido brasileiro. (BCR- Bactéria de crescimento rápido. BCL – Bactérias de crescimento lento). 16
- Figura 3.** Frequência de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto a resposta à tolerância a pH extremos. BCR, frequência relativa as bactérias de crescimento rápido (32 isolados), BCL, frequência relativa as bactérias de crescimento lento (18 isolados) e Total, resultado referente aos 50 isolados testados. 18
- Figura 4.** Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi resistentes a diferentes antibióticos (A) e segundo hábito de crescimento em meio de cultivo (BCR – Bactérias de crescimento rápido e BCL – Bactérias de crescimento lento) (B). AMI – Amicacina (30 µg/disco), AMP – Ampicilina (10 µg/disco), CFL – Cefalotina (30 µg/disco), CFZ – Cefazolina (30 µg/disco), CTX - Cefotaxima (30 µg/disco), CFO – Cefoxitina (30 µg/disco), CIP – Ciprofloxacina (5 µg/disco), CLO – Clorafenicol (30 µg/disco), GN – Gentamicina (12 µg/disco), KAN – Kanamicina (30 µg/disco), SUT – Sulfadiatrim (25 µg/disco) e TET – Tetraciclina (30 µg/disco). 21
- Figura 5.** Dendrograma de similaridade entre bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi nativas de solos do semiárido quanto à resistência e sensibilidade a doze antibióticos. ... 22
- Figura 6.** Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono. (As fontes de carbono de barras cinza são carboidratos, barras pretas são sais orgânicos e barras hachuradas ácidos orgânicos). 24
- Figura 7.** Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto ao hábito de crescimento capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono. BCR-Bactérias de crescimento rápido. BCL-Bactéria de crescimento lento. 25
- Figura 8.** Esquema utilizado para cálculo do índice de solubilização (I.S.= Diâmetro do halo-DH/Diâmetro da colônia-DC) (A) e as três possíveis respostas (B): I – bactéria não cresce, II – bactéria cresce, mas não solubiliza e III – bactéria solubiliza o fosfato 27
- Figura 9.** Percentual de bactérias de crescimento rápido (BCR) e lento (BCL) isoladas de nódulos de feijão-caupi nas diferentes classes de resposta ao crescimento em meio de cultivo com fósforo de cálcio. S – Solubilizou fósforo de cálcio presente no meio, CNS – Cresceu mas não solubilizou o fosfato e NC – Não cresceu. 29
- Figura 10.** Produto da extração de DNA de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. M – Marcador 1 Kb plus, 1: Isolado 111-3, 2: 161-2, 3: 173-2, 4: 211-1, 5: 221-2, 6: 222-4, 7: 262-4, 8: 263-3, 9: 271-4, 10: 273-7, 11: 312-7, 12: 312-10, 13: 331-4, 14: 352-3, 15: 362-1, 16: 371-2, 17: 371-6, 18: 372-5, 19: 422-2, 20: 443-5, 21: 451-5, 22: 451-10, 23: 461-6, 24: 462-1, 25: 471-6, 26: 472-2, 27: 472-5, 28: 512-3, 29: 541-3, 30: 573-5, 31: 122-1, 32: 131-1, 33: 143-1, 34: 551-3, 35: 111-4, 36: 111-6, 37: 112-1, 38: 112-5, 39: 113-2, 40: 113-3, 41: 131-3, 42: 211-2, 43: 223-4, 44: 241-2, 45: 271-2, 46: 313-8, 47: 352-7, 48: 352-10, 49: 352-10, 50: 353-3, 51: 452-9, 52: 471-2, 53: 473-2 54: 242-10. ... 31

Figura 11. Produto de ITS-PCR de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. M – Marcador 1 Kb plus, 1: Isolado 111-3, 2: 161-2, 3: 173-2, 4: 211-1, 5: 221-2, 6: 222-4, 7: 262-4, 8: 263-3, 9: 271-4, 10: 273-7, 11: 312-7, 12: 312-10, 13: 331-4, 14: 352-3, 15: 362-1, 16: 371-2, 17: 371-6, 18: 372-5, 19: 422-2, 20: 443-5, 21: 451-5, 22: 451-10, 23: 461-6, 24: 462-1, 25: 471-6, 26: 472-2, 27: 472-5, 38: 512-3, 29: 541-3, 30: 573-5, 31: 122-1, 32: 131-1, 33: 143-1, 34: 551-3, 35: 111-4, 36: 111-6, 37: 112-1, 38: 112-5, 39: 113-2, 40: 113-3, 41: 131-3, 42: 211-2, 43: 223-4, 44: 241-2, 45: 271-2, 46: 313-8, 47: 352-7, 48: 352-10, 49: 352-10, 50: 353-3, 51: 452-9, 52: 471-2 e 53: 473-2.....	32
Figura 12. Dendrograma de similaridade gerado pelo fingerprinting utilizando o <i>primer</i> BOX-1A de isolados nativos de solos do semiárido brasileiro obtidos de nódulos de feijão-caupi.	35

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1. Resposta de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi ao crescimento em meio de cultura YMA com valores de pH extremos e alterações no padrão de pH do meio.	19
Tabela 2. Índice de resistência múltipla (IRM) a antibióticos de amostras de bactérias com diferentes hábitos de crescimento isolados de nódulos de feijão-caupi.....	20
Tabela 3. Características dos grupos gerados com base no perfil de resistência a doze antibióticos de 50 bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi.....	23
Tabela 4. Perfis de atividade enzimática identificados por API20NE em bactérias com diferentes hábitos de crescimento isoladas de nódulos de feijão-caupi.....	26
Tabela 5. Índice de solubilização e características relativas à solubilização de fosfato de cálcio em meio GL por bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O Semiárido brasileiro.	3
2.2	A Cultura do Feijão-caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp].	3
2.3	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).	4
2.4	Diversidade de Bactérias que Nodulam Feijão-caupi.	5
2.5	Caracterização de Bactérias que Nodulam Leguminosas.	6
2.5.1	Caracterização fenotípica.	6
2.5.2	Caracterização genotípica.	7
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1	Origem e Seleção dos Isolados.....	9
3.2	Recuperação dos Isolados e Confirmação da Pureza do Inoculo.....	9
3.3	Caracterização fenotípica.	9
3.3.1	Ensaio de tolerância à temperatura e ao cloreto de sódio (NaCl).	9
3.3.2	Tolerância a valores extremos de pH.....	9
3.3.3	Ensaio de resistência intrínseca a antibióticos.	10
3.3.4	Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e testes enzimáticos.	10
3.3.5	Solubilização de fosfato de cálcio.	11
3.4	Caracterização Genética.	11
3.4.1	Extração de DNA genômico.	11
3.4.2	Caracterização quanto a variabilidade do tamanho do espaço intergênico 16S-23S rRNA.....	12
3.4.3	Análise genotípica pelo perfil BOX.....	12
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1	Tolerância ao Estresse de Temperatura e ao NaCl.....	14
4.2	Tolerância a Valores de pH Extremos.....	17
4.3	Resistência Intrínseca a Antibióticos.	19
4.4	Uso de Diferentes Fontes de Carbono e Atividade Enzimática Avaliada Utilizando kit API20NE.	23
4.5	Solubilização de Fosfato de Cálcio (SFC).	27
4.6	Variabilidade no Tamanho do Espaço Intergênico 16S-23S rRNA.....	30
4.7	Diversidade Genética dos Isolados Segundo Perfil de Banda Gerados pelo <i>primer</i> BOX.	33
5	CONCLUSÕES	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8	ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro é considerado a região semiárida mais populosa do mundo, com aproximadamente 18 milhões de habitantes (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2009). Os limites geográficos da zona climática que caracteriza o semiárido brasileiro são semelhantes aos que limitam o território que é ocupado pela Caatinga, vegetação típica do Nordeste do Brasil. Essa vegetação é predominantemente composta por plantas xerófitas, que durante os períodos de seca perdem as folhas como estratégia de reduzir a perda de água por evapotranspiração.

A Caatinga é um bioma de ocorrência única no Brasil. Neste ambiente a diversidade de espécies de plantas e animais representa um recurso importante para a biodiversidade brasileira. Embora levantamentos tenham sido feitos para prospecção desta biodiversidade, poucos têm sido aqueles que tenham como alvo a diversidade abaixo da superfície do solo.

O solo é um recurso natural que pode abrigar uma alta biodiversidade de organismos. Estima-se que a diversidade de organismos abaixo do nível do solo seja muito superior àquela encontrada acima de seu nível. Grande parte desta biodiversidade é composta por populações de microrganismos com uma ampla diversidade genotípica e metabólica, sendo as bactérias seus principais representantes.

As populações de microrganismos presentes nesse ambiente desempenham funções para manutenção dos sistemas ecológicos que apresentam potencial biotecnológico para utilização na agricultura e na indústria, como: produção de enzimas hidrolíticas, produção de biosurfactantes, solubilização de fosfatos, biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo e a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A fixação biológica de nitrogênio é uma função ecológica desempenhada por bactérias que possuem em seu aparato enzimático a enzima nitrogenase, responsável pela transformação do nitrogênio atmosférico em nitrogênio amoniacal prontamente assimilável pelas plantas. Bactérias que possuem a enzima nitrogenase são denominadas diazotróficas.

Entre as bactérias diazotróficas as pertencentes ao grupo do rizóbio tem sido alvo de muitos estudos de diversidade e seleção para produção de inoculantes microbianos. Os rizóbios estabelecem associação simbiótica com plantas da família das Fabaceas (antiga Leguminosa). Esta associação é caracterizada pela formação de nódulos nas raízes ou caule da planta, este é considerado um marcador morfológico da associação. Dentro do nódulo a bactéria fixa o nitrogênio e disponibiliza-o para a planta. A energia necessária para a fixação do nitrogênio atmosférico pela bactéria é fornecida pela planta a partir de compostos de carbono derivados do processo de fotossíntese. A simbiose, então, é caracterizada pela troca de C e N entre a planta e a bactéria.

Os rizóbios representam um recurso natural de potencial biotecnológico muito importante para o cultivo de leguminosas. O exemplo da inoculação da soja [*Glycine max* (L.)] com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. mostra o potencial deste recurso em substituir a adubação nitrogenada em cultivos agrícolas.

Semelhante a soja, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] também estabelece associação com bactérias do grupo do rizóbio e tem como simbioses mais eficientes os pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2006; SOARES et al., 2006; MARTINS, 1997) e pode ter sua demanda por nitrogênio suprida via atividade da fixação biológica de nitrogênio (RUMJANEK et al., 2006).

O Brasil é o maior produtor de feijões no mundo e estima-se que 30% do feijão produzido sejam de feijão-caupi, sendo o Norte e o Nordeste as regiões de maior produção (FILGUEIRAS et al., 2009). No Nordeste, o feijão-caupi é uma importante fonte de proteínas

de origem vegetal, apresentando conteúdo protéico na ordem de 23 a 30%, dependendo do cultivar (SILVA et al., 2002). Embora seja uma cultura comum em sistemas de produção agrícola de base familiar, o cultivo de feijão-caupi tem se expandido para áreas mais tecnificadas da região Centro Oeste (SINIMBU, 2009). Este avanço aponta para o potencial do mercado de inoculantes para feijão-caupi, o que reforça a necessidade do conhecimento da ecologia das bactérias que nodulam esta leguminosa.

A ecologia de bactérias formadoras de nódulos em feijão-caupi, na região do semiárido brasileiro, no que se diz respeito a sua diversidade e distribuição, é pouco conhecida. A prospecção de bactérias de nódulos de feijão-caupi representa uma estratégia importante nesta região, pois é o passo inicial para a seleção de estirpes eficiente para confecção de inoculantes para uso biotecnológico, em especial nos sistemas de produção agrícola onde o aporte de tecnologia é baixo, como em áreas trabalhadas pela agricultura familiar, comum no Nordeste.

Sob a hipótese de que bactérias presentes em solos do semiárido brasileiro que nodulam feijão-caupi apresentam alta diversidade, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Semiárido Brasileiro

O Semiárido brasileiro é um dos maiores, mais populosos e também mais secos do mundo. Estende-se por 868 mil quilômetros, abrangendo o norte dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, os sertões da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e uma parte do sudeste do Maranhão. Estima-se que nessa região vivam mais de 18 milhões de pessoas, sendo 8 milhões na área rural. A precipitação pluviométrica é de 750 milímetros anuais, em média. Em condições normais, chove mais de 1.000 milímetros (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2009).

Atualmente o Semiárido abrange 1.133 municípios, incluindo 102 que passaram a fazer parte em 2005. Com essa atualização, a área classificada oficialmente como semiárido brasileiro aumentou de 892.309,4 km² para 969.589,4 km². O estado de Minas Gerais teve o maior número de inclusões na nova lista, antes com 40 municípios e atualmente com 85 (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2009).

Nesta zona climática está inserido o bioma Caatinga, único ecossistema exclusivamente brasileiro. A diversidade biológica neste bioma ainda é pouca conhecida. Estudos liderados pela UFPE avaliando a riqueza de espécies animais e vegetais, revelaram que a região apresenta 327 espécies de animais e 323 de plantas endêmica (FAPESP, 2009).

A diversidade de organismos que habitam os solos neste bioma ainda é muito desconhecida. Uma vez que os microrganismos estabelecem interações com as plantas, esta grande diversidade de organismos acima do solo pode esconder uma grande diversidade de microrganismos abaixo dele.

Neste cenário é comum a retirada da mata nativa por pequenos agricultores que empregam a técnica de queimada para abrir roças e realizarem o plantio. Em grande parte, as culturas trabalhadas são feijão-caupi e o milho, normalmente manejadas em consórcio (FREIRE FILHO, 2005). O feijão-caupi apresenta boa adaptabilidade aos solos e ao clima do Nordeste, representando quase a totalidade das áreas cultivadas com feijões (FILGUEIRAS et al., 2009), sendo uma das mais importantes leguminosas de grãos no Semiárido (SANTOS et al., 2000).

2.2 A Cultura do Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp].

O feijão-caupi é uma cultura muito conhecida entre os agricultores de base familiar do Norte e Nordeste do Brasil. Acredita-se que esta cultura tem sua origem na África e que foi introduzida no Brasil, pela Bahia, no período da colonização (FILGUEIRAS et al., 2009) estando hoje presente em todas as regiões do país. Assume importância estratégica na dieta alimentar dos sertanejos por ser sua principal fonte de proteínas de origem vegetal, apresentando conteúdo protéico na ordem de 23 a 30%, dependendo do cultivar (SILVA et al., 2002), sendo também rica em ferro, zinco e potássio (FROTA et al., 2008) e vitaminas do complexo B (MOREIRA et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor de feijões no mundo e consumidor de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com produção nacional de grãos de feijões (comum e caupi) na safra 2007/2008 de 3.544,7 t (CONAB, 2009). Estima-se que 70% do feijão produzido no território brasileiro sejam de feijão comum e 30% de feijão-caupi (FILGUEIRAS et al., 2009). Considerando apenas a produção de grãos de feijão-caupi, o país assume o terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais, atrás da Nigéria e Níger (FILGUEIRAS et al., 2009,

RODRIGUES et al., 2004). Atualmente é exportado para seis países (EMBRAPA, 2007) e apresentando grande potencial para indústria alimentícia na preparação de chips, tortillas e “snacks”, derivados da farinha feita com o feijão-caupi e muito consumidos nos Estados Unidos (LIMA et al., 2008). Segundo Filguerias et al. (2009), estima-se que a área colhida com feijão-caupi no Brasil esteja na faixa de 1.500 mil hectares ano⁻¹.

Embora seja comumente encontrado em sistemas de produção agrícola onde o aporte de tecnologia é baixo, como em áreas de pequenos produtores, o feijão-caupi avança para outros cenários, sendo introduzido no Cerrado como cultura de safrinha, especialmente em Primavera do Leste no estado do Mato Grosso. Os agricultores desta região encontraram nesta cultura a oportunidade de boas produções em suas propriedades na entre safra da soja, período em que as chuvas nem sempre permitem altos rendimentos do milho, por exemplo. Nesta região a produtividade do feijão-caupi tem alcançado médias de 1,2 t.ha⁻¹ e estima-se para este ano o plantio de 120 mil hectares com esta cultura (SINIMBU, 2009).

É uma cultura cujo aporte de nitrogênio pode ser atendido pela associação com bactérias do grupo do rizóbio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e por apresentar baixa especificidade hospedeira é muito empregado em estudos de diversidade de rizóbio (LAMMEL, 2007; MELLONI et al, 2006; SOARES, 2006; LIMA et al., 2005; ZILLI et al., 2004; MARTINS et al., 1997;).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

O nitrogênio (N) é um elemento limitante ao desenvolvimento das plantas sendo classificado, dentro dos critérios de essencialidade, como macronutriente primário. Os solos da zona tropical são, em geral, pobres em N, requerendo o suprimento deste elemento para que sejam alcançadas altas produtividades nas lavouras. A matéria orgânica é a principal fonte de N no solo, podendo o requerimento de N pelas plantas ser atendido via aplicação de fertilizantes nitrogenados.

No ciclo biogeoquímico do N, a entrada deste elemento no solo possui uma via biológica resultante da interação entre grupos de procariotos diazotróficos e plantas vasculares, resultando no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esse processo é bem comum em plantas da família das leguminosas, e identificado pela presença de uma estrutura peculiar resultante da associação planta-bactéria, o nódulo. Embora comum nas raízes, nódulos também podem ser encontrados no caule (MARTINS et al., 2001).

Aumentos significativos no rendimento de grãos do feijão-caupi têm sido evidenciados pela prática da inoculação com estirpes de rizóbio (SOARES et al., 2006; LACERDA et al., 2004; MARTINS et al., 2003). Martins et al. (2003) verificaram rendimento de aproximadamente 700 kg ha⁻¹ em sistemas de cultivo sob condição de sequeiro no Nordeste. Em Minas Gerais a inoculação com rizóbio proporcionou rendimento de 1400 kg ha⁻¹, assemelhando ao tratamento nitrogenado (LACERDA et al., 2004). No estado de Roraima a média de rendimento alcançada pela inoculação foi de 1600 kg ha⁻¹, com aumento de 30% em comparação com o controle (ZILLI et al., 2008).

Atualmente são recomendadas três estirpes para inoculação de feijão-caupi no Brasil: UFLA 3-84 1 (=SEMIA 6461), BR3627 (=SEMIA 6462), INPA 03-11B (=SEMIA 6463); todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* spp.. Estirpes de crescimento rápido, fenótipo comum de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*), têm mostrado bom desempenho simbiótico com feijão-caupi, tanto em casa-de-vegetação (SEIDO, 2009) como em campo (FREITAS et al., 2009), evidenciando que este grupo possui potencial para seleção de inoculante.

2.4 Diversidade de Bactérias que Nodulam Feijão-caupi.

O feijão-caupi é uma leguminosa que pode ter seu requerimento de N atendido pela associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (RUMJANEK et al., 2006). Devido à baixa especificidade na associação com estirpes de rizóbio, o feijão-caupi é muito empregado em estudos que objetivam determinar a diversidade de rizóbios nativos (LAMMEL, 2007; ZILLI et al., 2004; MARTINS et al., 1997), avaliar o impacto de sistemas de produção agrícola (LEITE et al., 2009; PERREIRA, 2000) e o impacto de estratégias para reflorestamento sobre este grupo chave de microrganismos (MELLONI et al., 2006, MOTTA, 2002).

Embora a especificidade hospedeira seja baixa, o feijão-caupi é considerado como sendo predominantemente nodulado por isolados com características típicas de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* sp. (MARTINS et al., 1997; MELLONI et al., 2006) que por sua vez compreendem estirpes de crescimento lento e com habilidade de alcalinizar o meio de cultura (SANTOS et al., 2007). No entanto, levantamentos recentes têm mostrado que bactérias de crescimento rápido e reação ácida têm ocorrido com maior frequência nodulando esta espécie (LEITE et al., 2009; MEDEIROS et al., 2009, MARRA, 2009, BEZERRA, 2009).

Martins (1996) relatou estas características de crescimento rápido em 25% dos isolados provenientes de amostras de solos de Petrolina, Sertão de Pernambuco, utilizando feijão-caupi como planta-isca. Esta frequência foi considerada alta. Em outro levantamento feito na região e utilizando cinco cultivares da mesma espécie, Leite et al. (2009) verificaram que 62% dos isolados obtidos apresentavam crescimento rápido. Os autores sugeriram a frequência de isolados de crescimento rápido de 25% para 62% na região possa estar relacionada a mudanças no clima, uma vez que variações positivas na temperatura foram verificadas neste período por Angelotti et al. (2009).

O grupo do rizóbio é constituído por α -proteobactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O paradigma de que só bactérias do grupo do rizóbio possuíam a habilidade de formar nódulos em leguminosas foi quebrado com a descoberta de outras α -proteobactérias nodulando leguminosas, como *Shinella kummerowiae* nodulando *Kummerowia stipulacea* (LIN et al., 2008), *Desvovia neptuniae* nodulando *Neptunia natans* (RIVAS et al., 2003), *Phyllobacterium trifolii* em *Trifolium repens* (VALVERDE et al., 2005) e *Methylobacterium nodulans* em *Crotalaria glaucoides* (SY et al., 2001); e algumas pertencendo ao grupo das β -proteobactérias: *Burkholderia sabiae* em *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Burkholderia nodosa* em *Mimosa bimucronata* e *Mimosa scrabella*, *Burkholderia mimosarum* em *Mimosa pigra*, (CHEN et al., 2008; 2007; 2006), *Burkholderia tuberum* em *Aspalathus carnosus* (ELLIOT et al., 2007, VANDAMME et al., 2002), *Burkholderia phymatum* em *Machaerium lunatum* (VANDAMME et al., 2002) e *Cupiravidus taiwanensis* em *Mimosa pudica* (CHEN et al., 2001), todas leguminosas tropicais. Estas descobertas revelam que o espectro de bactérias que nodulam leguminosas e fixam nitrogênio é amplo e diverso. Também, que a zona tropical pode revelar uma comunidade ainda mais diversa de bactérias que nodulam leguminosas, uma vez que todos estes novos simbiontes foram isolados de leguminosas tropicais, apesar de a China ser o país que mais descreve novas espécies.

Embora muito empregado para estudos de diversidade de rizóbio com base em características culturais, somente uma estirpe isolada de feijão-caupi nativa de solos do semiárido brasileiro foi descrita até o nível de espécie (ZILLI et al., 2006) e uma encontra-se em fase de descrição na Embrapa Agrobiologia. Esta estirpe, de crescimento rápido, que se encontra em fase de descrição apresentou baixa similaridade das seqüências de bases do gene *dp* RNA ribossomal 16S com estirpes já descritas da rizobiologia, sugerindo ser um novo simbionte.

Aplicando a técnica de ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado) em isolados representantes de levantamento de rizóbio na região do Vale do Submédio São Francisco, localizado no semiárido brasileiro, Leite et al. (2009) verificaram que treze isolados apresentaram perfil eletroforético distinto dos padrões de rizóbio depositados no banco de coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Um destes isolados mostrou similaridade com a espécie de *Methylobacterium nodulans*, única espécie deste gênero isolada de leguminosa (*Crotalaria pocarpa*) (SY et al., 2001).

2.5 Caracterização de Bactérias que Nodulam Leguminosas

2.5.1 Caracterização fenotípica

Os métodos fenotípicos para caracterização de bactérias são os mais difundidos nos laboratórios de microbiologia por serem de custo baixo. A caracterização fenotípica compreende resultados de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que permitem uma descrição inicial dos microrganismos em estudo e possibilitam agrupar os isolados por semelhança entre seus fenótipos.

Métodos fenotípicos para caracterização de bactérias que nodulam leguminosas (genericamente denominadas de rizóbio) são muitos empregados em estudos de diversidade (LEITE et al., 2009; MELLONI et al., 2006; JESUS et al., 2005) e permitem a distinção entre os dois principais grupos de rizóbio: o grupo das bactérias de crescimento rápido e o grupo das bactérias de crescimento lento (VINCENT, 1970). Esta separação é baseada no tempo que as bactérias levam para formar colônias isoladas em meio YMA (VINCENT, 1970). Moreira & Siqueira (2006) descrevem as características em meio de cultura YMA comumente apresentadas por bactérias pertencentes aos gêneros clássicos de bactérias que nodulam leguminosas: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*). Nesta descrição, os autores mostram a separação clara dos gêneros *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*) segundo o tempo de crescimento, reação do pH no meio de cultivo e cor da colônia.

Segundo Martins et al. (1997), os principais parâmetros utilizados na caracterização de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas são: tempo de crescimento em meio de cultura YMA, reação ácida ou básica em meio de cultura, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares (goma) e coloração da colônia. Estas mesmas características foram as que mais discriminaram as populações de rizóbio de diferentes sistemas de uso da terra em solos do semiárido brasileiro (LEITE et al., 2009).

Alguns descritores fenotípicos empregados para caracterização de bactérias têm como objetivo não somente a caracterização, mas a verificação de provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais predominantes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio. A capacidade de crescimento em diferentes pH's, tolerância a diferentes concentrações de NaCl, temperatura, resistência intrínseca à antibióticos e utilização de diferentes fontes de carbono são testes utilizados para caracterização de rizóbio (PONGSILP et al., 2010) e muito empregadas na descrição de descrição de novas espécies (CHEN et al., 2008; ELLIOT et al., 2007).

Os testes de tolerância a diferentes faixas de pH, temperatura de concentração de NaCl podem revelar a plasticidade da bactéria quando a adaptabilidade a solos com diferenças para estes fatores abióticos. A habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono pode ser usada para diferenciação das espécies de rizóbio (GRAHAM et al., 1991). O teste de utilização de diferentes fontes de carbono pode revelar o potencial do isolado para mobilizar carbono presente em moléculas com diferenças em sua natureza química. Esta caracterização pode ser

feita através do uso de kits comerciais para estudo de descritores bioquímicos, como o sistema API ou *Biolog Nutritional System* (HÜBNER et al., 2004).

Testes fenotípicos relacionados a atividades funcionais também tem sido utilizados para caracterizar rizóbio. O teste para verificar a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, por exemplo, tem sido muito empregado (RIVAS et al., 2006; HARA & OLIVEIRA, 2004; PEIX et al., 2001). Os rizóbio são conhecidos pela sua capacidade de suprir nitrogênio às leguminosas via fixação biológica de nitrogênio. No entanto o suprimento de fósforo às plantas como consequência de sua atividade solubilizadora tem sido demonstrado tanto em leguminosas (ALIKHANI et al., 2006; RIVAS et al., 2006; PEIX et al., 2001) como em plantas de não pertencente a esta família botânica (PEIX et al., 2001). Alikhani et al. (2006) verificaram que a estirpe *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* mobilizou 197.1 mg.L⁻¹ de fósforo inorgânico [Ca₃(PO₄)₂] por 360 h em meio líquido. Diferentemente, a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. apresentou melhor desempenho para solubilização de fósforo orgânico (inositol hexafosfato). Estes resultados mostram a capacidade de estirpes de rizóbio em disponibilizar fósforo para a nutrição de plantas. Este tipo de caracterização busca revelar quais outros serviços ambientais o rizóbio poderia estar executando além da fixação biológica de nitrogênio.

A caracterização fenotípica permite agrupar os isolados bacterianos e então selecionar aqueles com fenótipo de interesse para uma caracterização por meio de marcadores genotípicos, a fim de se identificar a espécie ou descrevê-la, caso trate de uma espécie ainda não conhecida.

2.5.2 Caracterização genotípica

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atual dominam os estudos taxonômicos (VANDAMME et al., 1996).

Dentre as técnicas de caracterização genotípica emprega para estudos de populações de bactérias que nodulam leguminosas, as que permitem a amplificação de seqüências repetidas do DNA, pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), proporcionando a formação de perfis eletroforéticos, têm sido internacionalmente utilizados para determinar a diversidade de rizóbio. Segundo Hungria et al. (2008), estes elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações e existem três famílias principais de elementos: as seqüências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), as seqüências ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e as seqüências BOX (box A, box B e box C). A distinção genotípica entre estirpes de rizóbio recomendadas para o cultivo de diferentes espécies de leguminosas foi verificada empregado os oligonucleotídeos ERIC, REP e BOX A1R (CHUEIRE et al., 2000; BANGEL, 2000).

O BOX-PCR é largamente utilizado para caracterização de bactérias que nodulam leguminosas em estudos de diversidade (LU et al., 2009, e KOEDOEBOEZ et al., 2009; LU et al., 2005), na descrição de novas estirpes (HAN et al., 2008) e como ferramenta para controle de qualidade de inoculantes (INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 30, MAPA).

Outra ferramenta de uso crescente na prática de identificação de bactérias é a amplificação e seqüenciamento de regiões específicas e conservadas do genoma para posterior comparação das seqüências obtidas com a de outros organismos disponíveis no banco de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI). As moléculas de RNA ribossomal 16S e 23S são comumente empregadas na taxonomia de procaríotos por serem regiões conservadas do genoma. No entanto, variabilidade para o tamanho da região intergênica 16S-23S foi utilizada para distinção de grupos de rizóbio (TAN et al., 2001).

Yang et al. (2005) mostraram que estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de *Arachis hypogaea* L. em solos na China que apresentavam alta similaridade para sequência do 16S rRNA, mostraram variabilidade para o tamanho do ITS. A variedade no comprimento do ITS também foi utilizada por Vineusa et al. (2005) também conseguiram distinguir estirpes de *Bradyrhizobium* que apresentavam alta similaridade do 16S rRNA identificando variabilidade do tamanho da região intergênica. No entanto, é possível que os isolados de crescimento lento com mesmo tamanho do ITS representem a mesma espécie (Rivas *et al.*, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e Seleção dos Isolados

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram procedentes de isolamento feito por Leite et al. (2009) em solos da região do Submédio Vale do São Francisco, situada dentro da zona climática do Semiárido do Nordeste do Brasil. A coleção resultante do isolamento, constituída por 581 isolados bacterianos de nódulos de feijão-caupi, está mantida a -72°C no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI) da Embrapa Agrobiologia. Esta coleção representa a diversidade biológica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em amostras de solos de sete diferentes sistemas de uso da terra (SUT) localizados nesta região. Foram selecionados 189 isolados a partir de 49 grupos fenotípicos (ANEXO 1) proveniente de solos sob sistemas de cultivo agrícola, solos de vegetação nativa (caatinga) e solos de vegetação ribeirinha do rio São Francisco (LEITE et al., 2009).

3.2 Recuperação dos Isolados e Confirmação da Pureza do Inoculo

Os 189 isolados selecionados foram em placas com meio de cultura YMA (FRED & WAKSMAN, 1928) e incubados a 28°C até obtenção de colônias isoladas. Após o crescimento, a pureza foi verificada pela visualização das características fenotípicas originais das colônias. Estas foram repicadas para uma nova placa com meio YMA e após o crescimento estas placas foram utilizadas como fonte de inoculo para os testes tolerância a temperatura e a NaCl.

3.3 Caracterização Fenotípica

3.3.1 Ensaio de tolerância à temperatura e ao cloreto de sódio (NaCl)

O perfil de tolerância à temperatura foi verificado submetendo os isolados ao crescimento a 39, 41, 43, e 45°C em meio de cultura YMA. Para o teste de tolerância ao NaCl, os isolados foram inoculados em meio YMA modificado para 1, 2, 3 ou 4% de NaCl e submetidos a 28°C . Os testes foram realizados em triplicata e o crescimento avaliado aos cinco (isolados de crescimento rápido) e aos 10 dias (para isolados de crescimento lento) após a incubação. Os dados foram convertidos em uma matriz binária e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard, empregando o programa PAST (HAMMER et al., 2001) para determinação dos perfis de tolerância. Com base nos perfis de tolerância à temperatura e ao NaCl, 50 isolados foram selecionados para os testes fenotípicos e genotípicos posteriores (ANEXO 2). Todos os 50 isolados foram confirmados com nodulantes em plantas de feijão-caupi em experimentos em vasos de Leonard (VINCENT, 1970) conforme Seido (2009).

3.3.2 Tolerância a valores extremos de pH

A capacidade destes isolados para tolerar valores extremos de pH foi feita em triplicata para cada isolado em meio YMA modificado para pH 4 e pH 10. Os isolados foram incubados a 28°C e a resposta foi comparada com o padrão de crescimento em meio YMA com pH 7 (controle). Isolados que apresentaram crescimento semelhante ao controle receberam um sinal positivo (+) sendo considerados tolerantes ao estresse e sinal negativo (-) para os que não mostraram crescimento. Os resultados foram convertidos numa matriz binária

e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA utilizando o índice de Jaccard. O agrupamento foi feito utilizando o programa PAST (Hammer et al., 2001).

3.3.3 Ensaio de resistência intrínseca a antibióticos

A resistência intrínseca a antibióticos foi testada em triplicata empregando a metodologia de difusão com discos impregnados com o antibiótico, utilizando o kit Sensibiotec do Cecon (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos). Os isolados foram crescidos em meio YM (líquido) sob rotação de 150 rpm a 28°C por três e seis dias para isolados de crescimento rápido e lento, respectivamente. Após o crescimento, os isolados (100 µL contendo 10⁹ células) foram inoculados em placa com meio TY (BERINGER, 1974). Foi estabelecido o teste de quatro discos por placa dispostos de maneira equidistante a fim de evitar a sobreposição das zonas de inibição. Os antibióticos testados foram: amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg/disco), cefalotina (30 µg/disco), cefazolina (30 µg/disco), cefotaxima (30 µg/disco), cefoxitina (30 µg/disco), ciprofloxacina (5 µg/disco), clorafenicol (30 µg/disco), gentamicina (12 µg/disco), kanamicina (30 µg/disco), sulfadiatrim (25 µg/disco) e tetraciclina (30 µg/disco). As placas foram incubadas por sete dias a 28°C. Após a incubação a resistência ou sensibilidade ao antibiótico foi verificada pelo diâmetro da zona de inibição de crescimento. O índice de múltipla resistência aos antibióticos para cada grupo de crescimento dos isolados (rápido e lento) foi calculado conforme Krumperman (1983), empregando a seguinte fórmula:

$$IRM = \frac{a}{b \cdot c}$$

onde:

IRM: Índice de resistência múltipla.

a: Valor global de resistência aos antibióticos da amostra. Somatório do número de antibióticos que o isolado mostrou ser resistente, para cada isolado do grupo avaliado.

b: Número de antibióticos avaliados.

c: Número de isolados testados da amostra (grupo).

Os resultados foram transformados em uma matriz binária e um dendrograma foi gerado agrupando os isolados pelo método UPGMA de acordo com os perfis de resistência empregando o coeficiente Jaccard. O dendrograma foi gerado utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

3.3.4 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e testes enzimáticos

A capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e o perfil enzimático foram determinados utilizando o kit API20NE (biomérieux), usualmente empregado em testes bioquímicos de isolados bacterianos. O ensaio foi feito segundo recomendações do fabricante, com inóculo ajustado para densidade ao ponto 5 na escala de McFarland. As leituras dos resultados, reações positivas ou negativas, foram feitas com um e dois dias para os isolados de crescimento rápido e com dois e sete dias para isolados de crescimento lento. Os resultados foram transformados em uma matriz binária, e os isolados agrupados segundo sua atividade enzimática e capacidade de utilização de carbono. Foi calculado o índice de utilização múltipla de carbono do grupo de isolados de crescimento rápido e lento. O índice foi adaptado a partir da fórmula utilizada para determinar o índice de múltipla resistência a antibióticos (KRUMPERMAN, 1983). As modificações feitas foram:

$$\text{IUMC} = \frac{a}{b \cdot c}$$

onde:

IUMC: Índice de utilização múltipla de carbono.

a: Valor global de utilização de fontes de carbono dos isolados da amostra. Somatório do número de fontes de carbono utilizadas por cada isolado do grupo avaliado.

b: Número de fontes de carbono avaliadas.

c: Número de isolados testados da amostra (grupo).

3.3.5 Solubilização de fosfato de cálcio.

A capacidade para solubilizar fosfato de cálcio pelos 50 isolados selecionados foi verificada utilizando meio GL desenvolvido por Sylvester-Bradley *et al.* (1982), contendo 10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 18 g de ágar por litro de meio. Após a esterilização e com temperatura em torno de 50°C foi adicionado, a 850 mL de meio, 50 mL de K₂HPO₄ (10%) e posteriormente 100 mL de CaCl₂ (10%), para a formação do precipitado insolúvel de CaHPO₄.

Culturas puras de cada isolado foram suspensas em solução salina (0,85% NaCl) e a D.O foi ajustada na escala 5 de McFarland. Cinco microlitros da suspensão foram inoculados em placas contendo meio GL, em quatro repetições para cada isolado, inoculando-os em quatro placas diferentes. A capacidade de solubilização foi identificada pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia. O índice de solubilização (IS) foi determinado medindo-se o diâmetro da colônia e do halo de solubilização a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital por um período de 18 dias.

Os isolados foram classificados quanto a capacidade de solubilização em baixa (IS < 2), média (2 = IS < 4) e alta (IS > 4) capacidade utilizando a fórmula $IS = f \text{ halo (mm)} / f \text{ colônia (mm)}$ (BERRAQUERO *et al.*, 1976). Quanto ao tempo que levou para iniciar a solubilização, os isolados foram classificados como precoces (quando o início da solubilização se deu até o terceiro dia) e tardios (com início da solubilização a partir do terceiro dia). Os que não apresentaram solubilização visível até o décimo segundo dia de avaliação foram considerados como não solubilizadores. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância empregando o teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2003).

3.4 Caracterização Genética

3.4.1 Extração de DNA genômico

Colônias puras dos isolados crescendo em meio YMA foram repicadas para tubos de 1,5 mL e resuspendidas adicionado-se 600 µL de tampão TES (0,05M de NaCl; 0,01M de Tris HCl SDS 1%, pH 8) agitando-se em vórtex até desprendimento do pellet. O procedimento de extração de DNA seguiu protocolo descrito por Schwieger & Tebbe (1998) e modificado por Xavier *et al.* (2004). Os tubos com as amostras foram colocados em caixa de isopor e nitrogênio líquido foi adicionado, deixando as amostras no mesmo por 5 minutos. Com auxílio de uma peneira de plástico, os tubos foram transferidos para um Thermomixer onde permaneceram sob agitação por 5 min. a 65°C, seguida de agitação em vórtex em velocidade máxima por 10 s. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes. Em seguida 8,4 µL de proteinase K (20 mg.m L⁻¹) foi adicionado a cada amostra e agitado em vórtex em velocidade máxima. Posteriormente as amostras foram incubadas em Thermomixer a 16,1 x g a 65°C por 60 min. Em capela de exaustão 600 µL de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1) foi

adicionada em cada amostra e esta posta para agitar durante 10 s em vórtex em velocidade máxima. Após este passo as amostras foram centrifugadas a 7500 x g por 6 min. O sobrenadante foi transferido, em capela de exaustão, para outro microtubo novo e estéril. Ainda em capela de exaustão, foi adicionado cloroformio:álcool isoamílico (24:1) em cada amostra com igual volume do sobrenadante recuperado e a seguir centrifugada a 7500 x g por 6 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e recebeu um volume de isopropanol a cerca de -20°C igual ao do sobrenadante. As amostras foram homogeneizadas leve agitação vertendo lentamente por dez vezes. As amostras foram incubadas por uma noite em freezer (cerca de -20°C). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 16100 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi seco em centrífuga à vácuo por 20 minutos. O pellet foi ressuspensionado adicionando-se às amostras 50 μL de tampão TE e estas foram estocadas em freezer.

A extração de DNA genômico foi checada em gel de agarose a 1%, fundido em tampão TAE 1 X. Uma alíquota de 3 μL de cada amostra mais 2 μL de tampão de amostra (sacarose 40%; azul de bromofenol 0,25%) foram distribuídos nos poços do gel e submetido a eletroforese a 75V por 30 min. Após a migração das amostras o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e visualizado em fototransluminador (KODAK GL100). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o marcador 1 kb plus DNA LadderTM (InvitrogenTM).

3.4.2 Caracterização quanto a variabilidade do tamanho do espaço intergênico 16S-23S rRNA

O espaço intergênico ribossomal 16S-23S foi amplificado por PCR utilizando os *primers* ITSF (5-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3) e ITSReub (5-GCCAAGGCATCCACC-3) (Cardilane et al., 2004). A PCR foi realizada em um volume de 25 μL misturando 1 μL de DNA extraído com tampão de reação 1X, MgCl_2 1,5 mM, Taq DNA polimerase 1,75U (Invitrogen cat. N° 11615-010), dNTP 250 uM e 0,2 uM de cada *primer*. A amplificação constituiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 7 min. O produto da amplificação foi migrado em gel de agarose 1,5% por 2 horas a 100V. As bandas foram visualizadas em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado em brometo de etídeo ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para comparar o tamanho foi utilizado o marcador molecular 1 kb plus DNA LadderTM (InvitrogenTM).

3.4.3 Análise genotípica pelo perfil BOX

A análise da diversidade genotípica entre os isolados foi determinada pelo perfil BOX. Para a amplificação do DNA foi utilizado o *primer* BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994). A reação de amplificação foi feita em um volume final de 25 μL , contendo: água ultra pura estéril, 13,8 μL ; dNTPs, 5,0 μL (estoque com 1,5 mmol.L⁻¹ de cada base); tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 2,5 μL ; MgCl_2 , 1,5 μL (50 mmol.L⁻¹); iniciadores, 1,0 μL (50 pmol. μL^{-1}); DNA, 1,0 μL (50 ng. μL^{-1}); Taq, 0,2 μL (5 U. μL^{-1}). A amplificação seguiu os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 40°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C . Depois da amplificação, 5 μL de tampão (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol) foram adicionados a 10 μL de cada reação. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a voltagem de 80 Volts em temperatura ambiente por 5 h. Para comparar o tamanho foi utilizado o marcador molecular 1 kb plus DNA LadderTM (InvitrogenTM). O perfil de bandas gerado foi

visualizado em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado com brometo de etídeo (5 mg.mL^{-1}) e descorado em água destilada por 2 h.

Os perfis de bandas foram analisados pelo programa Gel Compar 2.0 *Applied Maths* baseado no coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade. Os perfis dos isolados foram comparados com as estirpes padrões de *Azorhizobium caulinodans* BR 5410, *Bradyrhizobium elkanii* BR 115, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 94, *Mesorhizobium huakuii* BR 524, *Rhizobium tropici* BR322, *Rhizobium etli* BR 10026, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* BR 10052, *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* BR 112, *Cupiravidus taiwanensis* BR3471-1, *Burkholdeira sabia* BR 3407, *Burkholdeira nodosa* BR3457, obtidas da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tolerância ao Estresse de Temperatura e ao NaCl

Os testes de tolerância à temperatura e ao cloreto de sódio (NaCl) salinidade são importantes fatores para caracterização e descrição de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas, pois podem inibir seu crescimento e multiplicação (ELBOUTAHIRI et al., 2010; PETER et al., 2009). A tolerância a estes fatores é uma característica intrínseca destes organismos e podem ser resultado da adaptação ao ambiente em que se estabelecem. Neste estudo, bactérias com diferentes hábitos de crescimento *in vitro* isolados de nódulos de feijão-caupi foram avaliadas quanto à tolerância ao estresse de temperatura e capacidade para crescer em meio YMA com diferentes concentração de NaCl. Após a triagem dos 189 isolados avaliados, verificou-se que houve uma queda no percentual de bactérias tolerantes à medida que ocorreu aumento do estresse e que esta redução foi mais pronunciada para o estresse induzido pelo NaCl, mostrando ser este fator mais limitante ao crescimento dos isolados, que o estresse de temperatura para as faixas testadas (**Figura 1-IA e IIA**).

A faixa de temperatura considerada ótima para crescimento de rizóbio é de 28-30°C (VINCENT, 1970). Do total de isolados avaliados, todos foram capazes de crescer a 39°C. Esta temperatura é considerada limitante para crescimento de *Rhizobium leguminosarum* (35°C), *Rhizobium loti* (37°C), *Sinorhizobium fredii* (36°C) e *Rhizobium galegae* (37°C), espécies com hábito de crescimento rápido, e para *Bradyrhizobium canariense* (37°C), espécie de crescimento lento (XAVIER et al., 2007, VINEUSA et al., 2005).

A 41°C, 154 isolados apresentaram crescimento positivo. Este número foi reduzido para 100 quando a temperatura era de 43°C. Com acréscimo da temperatura para 45°C, ocorreu uma redução de 59% dos isolados tolerantes a este estresse. Dos 78 isolados que foram capazes de crescer a 45°C, 45 eram de crescimento rápido. Este grupo de bactérias apresentou melhor desempenho frente ao estresse de temperatura evidenciado pela menor redução da frequência de isolados tolerantes (Figura 1-B).

O efeito do NaCl mostrou ser mais discriminatório para diferenciar as bactérias com os diferentes hábitos de crescimento. Esta discriminação já pode ser percebida com 1% de NaCl. Embora tanto rápidas como lentas mostrasse menor frequência de isolados tolerantes com o acréscimo de NaCl no meio de cultivo quanto comparado ao estresse de temperatura, esta redução foi mais pronunciada para os isolados de crescimento lento (Figura 1-B).

Quando submetidas ao nível de 3% de NaCl, 28 isolados foram capazes de manter crescimento semelhante à testemunha (0,002% de NaCl), sendo que 20 eram de crescimento rápido. Em 4% de NaCl, somente cinco isolados foram capazes de tolerar essa concentração, sendo quatro de crescimento rápido e um de crescimento lento (Figura 1-B).

Semelhante ao estresse de temperatura, o NaCl no meio de cultivo foi menos nocivo ao grupo de bactérias de crescimento rápido. A tolerância a estes dois fatores de estresse, pelo grupo de bactérias de crescimento rápido, pode estar associada à sua habilidade em exsudar grande quantidade de expolissacarídeos no meio de cultivo, composto resultante do metabolismo bacteriano cuja relação com tolerância a estresses ambientais tem sido relatada (NÓBREGA et al., 2004; REGUERA et al., 2009).

Xavier et al. (2007) verificaram o perfil de tolerância a estes mesmos estresses em bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi de três zonas climáticas do Nordeste (Zona da Mata, Agreste e Sertão). Os autores concluíram que os isolados precedentes do Sertão mostraram-se mais tolerantes à temperatura. Estes dados confirmam a ocorrência da alta

freqüência de isolados tolerantes à temperatura de 45°C encontrada neste estudo, uma vez que foram obtidos de solos do semiárido. Os autores ainda mostram que os isolados que cresceram a 3% de NaCl eram todos de crescimento rápido e que este fator mostrou efeito mais nocivo aos isolados de crescimento lento, o que condiz com os resultados aqui mostrados. Neste estudo o efeito do NaCl mostrou ser mais discriminatória entre os dois grupos de crescimento, concordando com dados de Xavier et al. (2007).

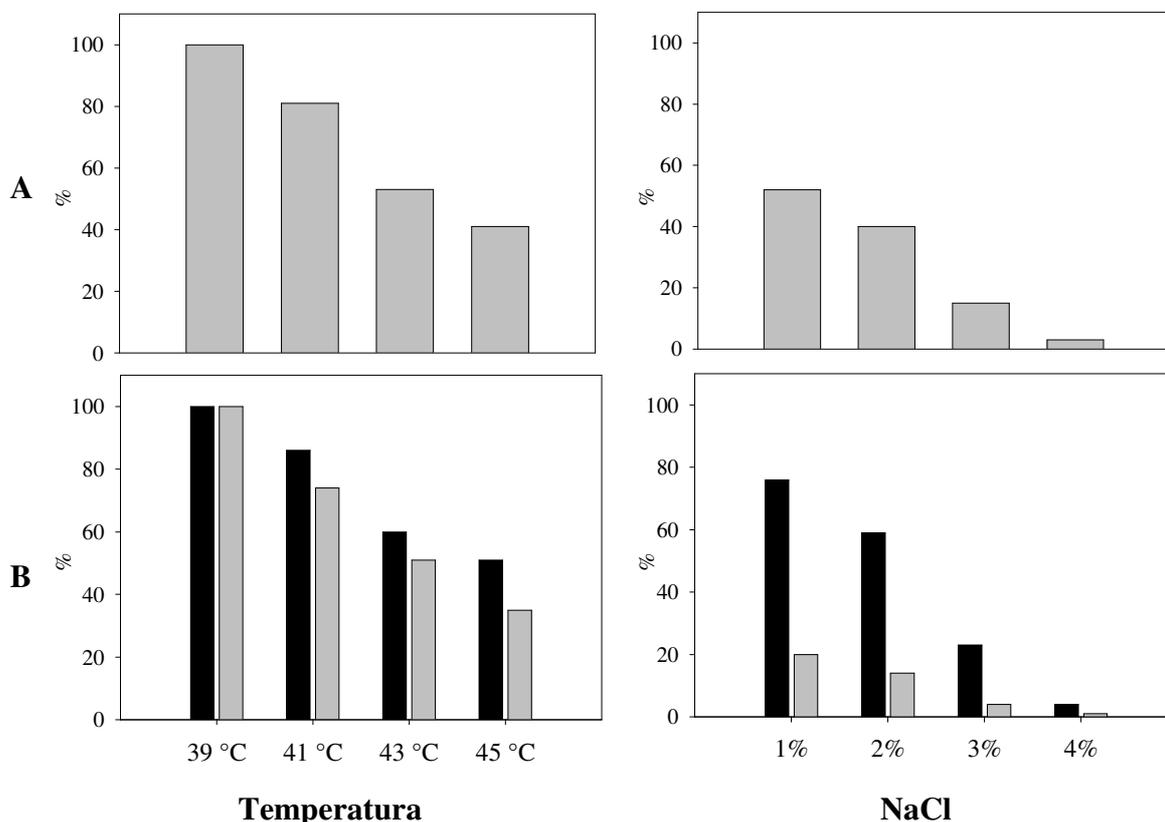


Figura 1. Frequência de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto à tolerância ao estresse de temperatura e concentração de NaCl. A – Frequências relativas à avaliação de 189 isolados. B – Frequências relativas à avaliação de 111 isolados de crescimento rápido (barras pretas) e de 78 isolados de crescimento lento (barras cinzas).

Bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* tem crescimento ótimo a temperatura de 28-30°C, podendo algumas espécies mostrar bom crescimento a temperaturas maiores que 40°C, como o *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Conforme *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, a tolerância a alta temperatura e concentração de NaCl é mais comum entre estirpes do gênero *Sinorhizobium* (= *Ensifer*). As estirpes tipo de *Sinorhizobium saheli* e *Sinorhizobium terangae* mantêm bom crescimento a temperatura de 44°C (DE LAJUDIE et al., 1994) e a estirpe de *Sinorhizobium medicae* é capaz de crescer a 40°C e a 2% de NaCl (ROME et al., 1996).

Em estudo realizado por Nóbrega et al. (2004), as estirpes de *Sinorhizobium* sp BR4007 e BR6806, isoladas de solos do Ceará, cresceram numa concentração de 1% de NaCl. Este gênero apresenta crescimento rápido e reação ácida em meio de cultivo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), características freqüentes entre isolados tolerantes. O gênero *Mesorhizobium* também possui membros tolerantes a temperatura e a concentração de NaCl

elevadas. *Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium mediterraneum*, por exemplo, toleram 40°C e crescem em meio com 2% de NaCl (NOUR et al., 1995).

Com base nos resultados de resposta ao estresse de temperatura e salinidade dos isolados foi possível identificar 18 perfis de tolerância (**Figura 2**).

Os perfis de tolerância Q, E, R e O foram os mais frequentes. Os perfis Q e O representam 28% dos isolados avaliados e possuem em comum o fato dos isolados serem tolerantes a 45°C. No entanto o perfil Q é predominantemente representado por bactérias de crescimento rápido, ao passo que o perfil O majoritariamente representado por bactérias de crescimento lento. No perfil N estão incluídos quatro isolados que mostraram ser tolerantes ao nível mais alto de temperatura (45°C) e NaCl (4%) testados neste estudo. Estes isolados são de crescimento rápido e metabolismo ácido.

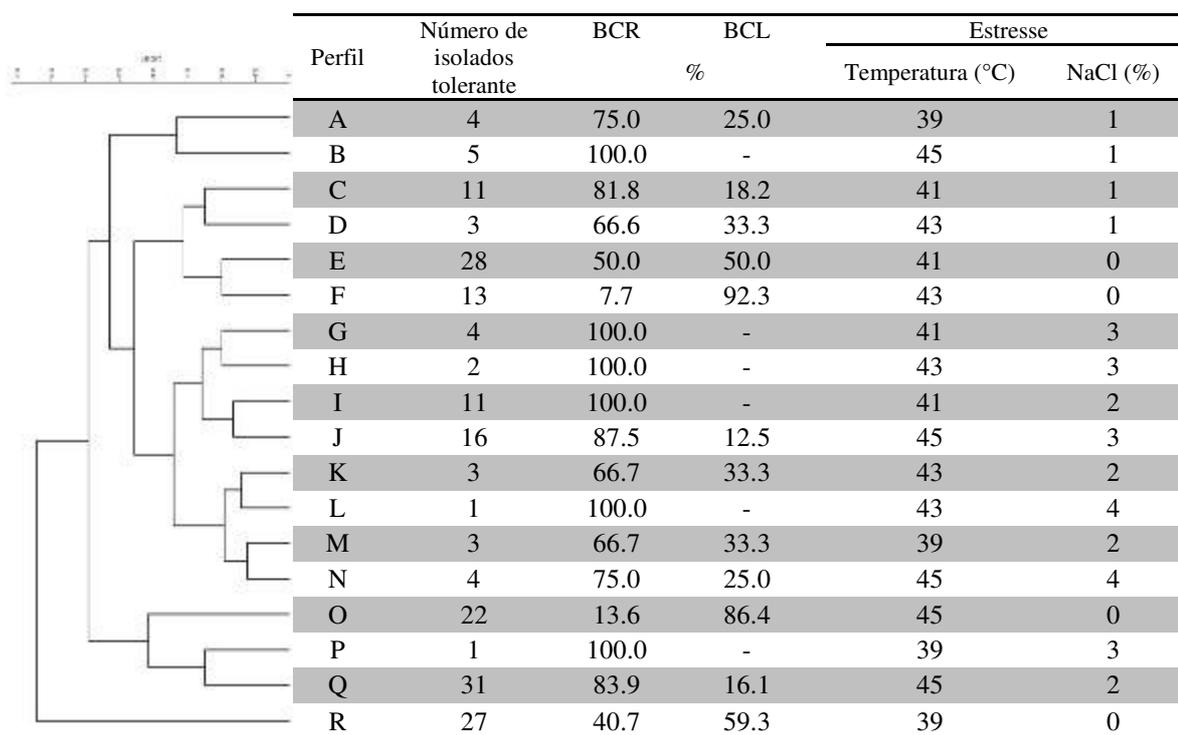


Figura 2. Perfis de tolerância a estresse abiótico de temperatura (39, 41, 43 e 45°C) e a concentrações de NaCl (1, 2, 3 e 4%) de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi nativas de solos do semiárido brasileiro. (BCR- Bactéria de crescimento rápido. BCL – Bactérias de crescimento lento).

A tolerância à temperatura elevada apresentada tanto pelas bactérias de crescimento rápido como pelas lentas pode ser resultado da adaptação ao ambiente de onde foram isoladas (Semiárido). Embora todas as bactérias tenham sido isoladas de solos não salinos, a tolerância ao estresse de salinidade apresentada pelas bactérias de crescimento rápido pode ser uma característica intrínseca ao grupo e pode estar relacionada à sua elevada produção de expolissacarídeos (REGUERA et al., 2009).

Considerando o hábito de crescimento, verificou-se que os isolados com habilidade para formar colônias isoladas com até 3 dias (rápidos) foram distribuídos nos 18 perfis de tolerância à temperatura e a NaCl, mostrando ser a população com maior variabilidade de

resposta para estes fatores quando comparados aos isolados de crescimento lento, que foram distribuídos em 12 perfis. Os perfis B, G, H, I, L e P foram exclusivos de bactérias de crescimento rápido (**Figura 2**). Este número de perfis revela uma ampla resposta das populações deste grupo de bactérias de solos nos Semiárido ao estresse de temperatura e salinidade.

De Lajudie et al. (1994) descreveram duas espécies de bactérias de crescimento rápido, que nodulam leguminosas, cuja temperatura máxima de crescimento é de 44°C: *Sinorhizobium saheli* e *Sinorhizobium teranga*. Comparando o perfil de restrição do gene 16S rRNA de estirpes isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos da China, Zang et al., 2007 identificaram quatro estirpes com similaridade de 100% com *Sinorhizobium fredii* USDA 205T, evidenciando ser este gênero um simbiote comum em feijão-caupi.

O espectro de resposta fisiológica aos fatores estressantes avaliados, somado à diversidade fenotípica mostrada por estes isolados (LEITE et al., 2009), revelam que os solos do Nordeste guardam uma alta diversidade de bactérias que nodulam feijão-caupi, representando uma base genética promissora para um programa de seleção de estirpes para produção de inoculantes, e até mesmo revelar novas espécies.

4.2 Tolerância a Valores de pH Extremos

A capacidade de 50 isolados, 32 de crescimento rápido e 18 de crescimento lento, representantes dos diferentes perfis de tolerância ao estresse de temperatura e a concentração de NaCl (Anexo 2), foi avaliada quanto ao crescimento a valores de pH extremos. Os resultados obtidos apontam para uma forte limitação ao crescimento no estresse de pH ácido (pH 4) (Figura 3). Neste valor de pH do total de isolados avaliados (50) somente 12 isolados apresentaram padrão de crescimento positivo, ao passo que 47 isolados foram capazes de apresentar crescimento positivo quando foram submetidos ao estresse de pH alcalino (pH 10).

Quando analisado sob o aspecto do hábito de crescimento, todos os isolados que cresceram a pH 4 eram rápidos. Ao pH 10, 97% e 89% das bactérias de crescimento rápido e lento, respectivamente, tiveram crescimento positivo.

Os únicos isolados que não cresceram em nenhum dos valores de pH testados foram 111-4, 143-1 e 352-7, sendo que o isolado 143-1 foi o único de crescimento rápido que não tolerou o pH 10 (Tabela 1.). Doze isolados cresceram nos dois extremos de pH, todos de crescimento rápido. Este resultado mostra maior versatilidade para resposta positiva ao estresse de pH pelas bactérias de crescimento rápido. Neste grupo de bactérias, e somente neste, foi identificada a habilidade para alterar o pH alcalino para neutro ou ácido como resposta do crescimento ao estresse (Tabela 1.).

Os isolados 352-3 e 451-5 além de crescerem nos dois valores de pH, mostram semelhança quando a habilidade para baixar o pH do meio de cultivo. O isolado 451-5 diminui o pH para neutro ao passo que o isolado 352-3 alterou o pH do meio de alcalino para ácido. Esprimeiro baixou o pH para faixa ácida e o o no etanto no pH ácido. Essa alteração pode ser o mecanismo fisiológico que as bactérias, assim como as demias, tenham utilizado para se adaptarem ao meio e então se multiplicarem.

A característica de alteração do pH foi observada pela mudança da coloração no meio de cultivo YMA com adição do corante azul de bromotimol, segundo Vincent (1970). Este corante permite identificar, com coloração amarela, valores de pH abaixo de 6,6 (ácido) e com coloração azul, valores de pH acima de 7,6 (alcalino). Neste estudo, 17 isolados apresentaram a característica de modificar o pH do meio. Destes, nove alteraram o pH alcalino (coloração azul) para pH neutro (coloração verde no meio) e oito para pH ácido (coloração amarela), isto representa um potencial deste isolados para diminuir o pH do meio na ordem de 3,4 e 2,4,

respectivamente. Essa característica representa uma vantagem ecológica das bactérias para se adaptarem a ambientes com pH alcalino.

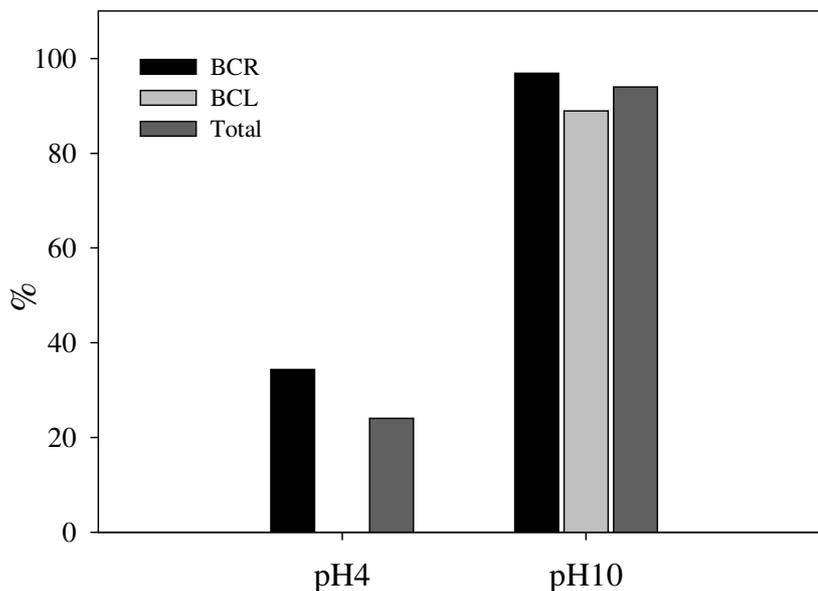


Figura 3. Frequência de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto a resposta à tolerância a pH extremos. BCR, frequência relativa as bactérias de crescimento rápido (32 isolados), BCL, frequência relativa as bactérias de crescimento lento (18 isolados) e Total, resultado referente aos 50 isolados testados.

O pH do solo é um dos atributos edáficos que limita a presença de microrganismos no solo (BROCKWELL et al., 1991). Segundo Figueiredo et al. (1996) a ocorrência de rizóbio de crescimento rápido ou lento parece estar relacionada com o pH do solo. Giondo et al. (2008) verificaram, ao avaliar os fatores ambientais do solo que afetavam a diversidade local de populações de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de nódulos de soja, que o pH do solo foi a principal característica que afetou a diversidade das populações de *Bradyrhizobium* spp, e que a menor diversidade foi encontrada nos solos com pH mais ácido.

Anyango et al. (1995) relatam que o tipo predominante de rizóbio pode ser resultado da faixa de pH do solo e que a diversidade é reduzida sob condições de acidez do solo. Este relato concorda com os dados encontrados por Leite et al. (2009) em solos do semiárido brasileiro. Neste estudo os autores encontraram maior frequência de bactérias de crescimento lento em solo com pH alcalino. Neste solo foi encontrada maior índice de diversidade que nos solos com pH ácido. Fierer & Jackson (2006) consideram o pH do solo um indicador da diversidade de bactérias do solo, onde os níveis mais baixos são encontrados em solos ácidos. Correlação entre diferentes níveis de pH do solo e diversidade genética de populações de rizóbio foi relatada por Laranjo et al. (2002).

Tabela 1. Resposta de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi ao crescimento em meio de cultura YMA com valores de pH extremos e alterações no padrão de pH do meio.

Isolado	pH		Alterou o pH de alcalino para		Isolado	pH		Alterou o pH de alcalino para	
	4	10	Neutro	Ácido		4	10	Neutro	Ácido
.....BCR*.....				BCR.....				
111-3	-	+	+		573-7	-	+		+
161-2	-	+			122-1	-	+	+	
173-2	+	+			131-1	-	+	+	
211-1	-	+	+		143-1	-	-		
221-2	-	+		+	462-3	-	+		
222-4	-	+		+	551-3	+	+		
262-4	-	+		+BCR.....				
271-4	+	+		BCR.....				
273-7	-	+	+		111-4	-	-		
312-7	+	+			111-6	-	+		
312-10	+	+			112-1	-	+		
331-4	-	+		+	112-5	-	+		
352-3	+	+		+	113-2	-	+		
362-1	+	+			113-3	-	+		
371-6	-	+		+	131-3	-	+		
372-5	-	+			223-4	-	+		
422-2	+	+			241-2	-	+		
443-5	+	+			242-10	-	+		
451-5	+	+	+		271-2	-	+		
451-10	+	+			313-8	-	+		
461-6	-	+			352-3	-	+		
462-1	+	+			352-7	-	-		
472-2	-	+	+		353-10	-	+		
472-5	-	+		+	353-6	-	+		
512-3	-	+	+		452-9	-	+		
541-3	-	+	+		473-2	-	+		

*BCR-Bactéria de crescimento rápido. BCL-Bactéria de crescimento lento.

4.3 Resistência Intrínseca a Antibióticos

A resistência aos doze antibióticos testados foi variável. Os antibióticos cefazolina, ampicilina, cefalotina e sulfadiazol foram tolerados por mais de 70 % dos isolados testados (Figura 4-A). Segundo Regitano e Leal (2010), a utilização de fármacos na pecuária intensiva (criação de bovinos, suínos e aves) representa a principal via de entrada de antibióticos no

ambiente, representado um potencial poluidor do solo e, portanto, podendo afetar a estrutura das populações de organismos do solo.

Neste estudo, os isolados mostraram maior sensibilidade para os antibióticos cefotaxima e tetraciclina. Os isolados de crescimento rápido mostraram, proporcionalmente, maior sensibilidade que os isolados de crescimento lento para os antibióticos amicacina, cefazolina, ciprofloxacina, clorafenicol, gentamicina e kanamicina. Já os isolados de crescimento lento mostraram maior sensibilidade aos antibióticos ampicilina, cefalotina, cefotaxima e cefoxitina (Figura 4).

Os antibióticos cefotaxima, cefoxitina e gentamicina foram os que mostraram maior distinção entre os grupos de crescimento bacteriano (Figura 4-B). Nenhum isolado de crescimento lento tolerou cefotaxima, ao passo que 38% dos isolados rápidos mostraram tolerância a este antibiótico. Os isolados de crescimento lento mostraram maior sensibilidade ao antibiótico cefoxitina, enquanto que os isolados de crescimento rápido mostraram maior sensibilidade para a gentamicina.

Estudos realizados por Xavier et al. (1998) e Maâtallah et al. (2002) mostram correlação entre hábito de crescimento e tolerância a diferentes antibióticos. Dowdle & Bohlool (1985) relatam que bactérias de crescimento lento são mais tolerantes a diferentes antibióticos. Esta informação concorda com os resultados obtidos neste estudo, onde as bactérias de crescimento lento mostraram ser mais tolerantes aos antibióticos testados, revelado pelo maior índice de resistência múltipla (Tabela 2). Florentino et al. (2010) identificou cinco estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de feijão-caupi tolerantes a quinze antibióticos. Sendo que duas dessas são recomendadas para produção de inoculantes do Brasil.

Tabela 2. Índice de resistência múltipla (IRM) a antibióticos de amostras de bactérias com diferentes hábitos de crescimento isolados de nódulos de feijão-caupi.

Grupo de crescimento*	Valor global de antibióticos tolerados (a)	Número testado de		IRM**
		isolados (b)	antibióticos (c)	
BCR	209	32	12	0,54
BCL	144	18	12	0,66

*BCR-Bactéria de crescimento rápido, BCL-Bactéria de crescimento lento

** Índice de resistência múltipla (IRM)= a/(b . c)

Os 50 isolados testados produziram 41 perfis de tolerância aos doze antibióticos e foram reunidos em sete grupos (Figura 5). Os isolados foram agrupados com base na resistência ou sensibilidade aos antibióticos que foram comuns aos membros do grupo (Figura 5). O grupo A foi formado por três isolados de crescimento rápido que mostraram mesmo padrão de crescimento para nove antibióticos, sendo resistentes a seis (ampicilina, cefalotina, cefazolina, cefoxitina, gentamicina e tetraciclina) e sensíveis a três antibióticos (amicacina, clorafenicol e kanamicina) (Tabela 3). Para os demais antibióticos os três isolados mostraram respostas variadas, sendo que cada isolado gerou um perfil único. O grupo B foi composto por dez isolados que geraram nove perfis distintos, sendo que todos mostraram ser resistentes a quatro antibióticos em comum (ampicilina, cefalotina, cefazolina e sulfadiatrim). No grupo C formando por onze isolados que mostraram dez perfis de resistência diferentes, os isolados

mostraram ser resistentes a quatro antibióticos (ampicilina, cefalotina, cefazolina e sulfadiatrim) e sensíveis a dois (gentamicina e tetraciclina). No grupo D foram agrupados todos os 18 isolados de crescimento lento, que mostraram resistência a cefazolina (CFZ) e a ciprofloxacina (CIP) e sensibilidade a cefotaxima (CTX). Estes isolados mostraram 12 diferentes perfis de resistência. A variedade de perfis dentro de cada grupo reflete a variabilidade de resposta dos membros do grupo ao demais antibióticos.

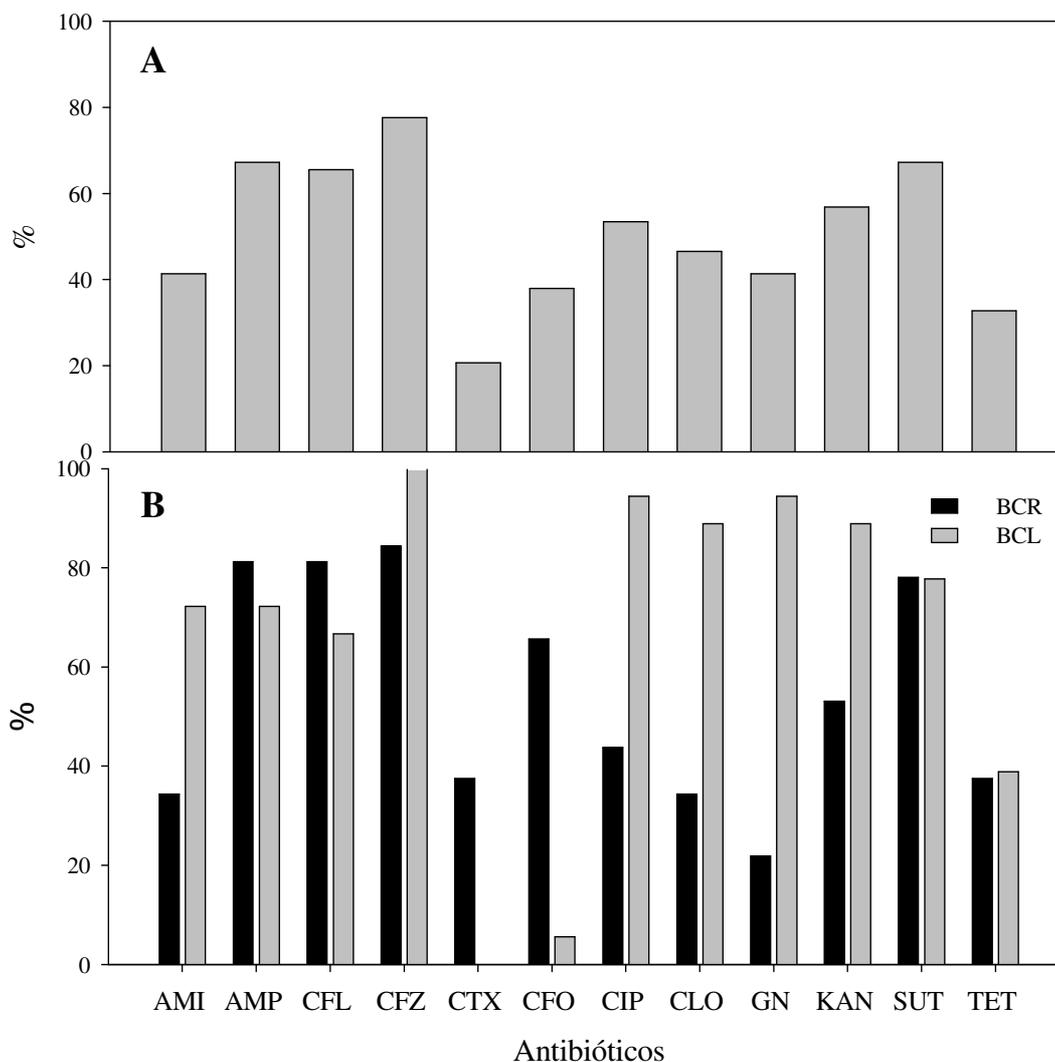


Figura 4. Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi resistentes a diferentes antibióticos (A) e segundo hábito de crescimento em meio de cultivo (BCR – Bactérias de crescimento rápido e BCL – Bactérias de crescimento lento) (B). AMI – Amicacina (30 µg/disco), AMP – Ampicilina (10 µg/disco), CFL – Cefalotina (30 µg/disco), CFZ – Cefazolina (30 µg/disco), CTX - Cefotaxima (30 µg/disco), CFO – Cefoxitina (30 µg/disco), CIP – Ciprofloxacina (5 µg/disco), CLO – Clorafenicol (30 µg/disco), GN – Gentamicina (12 µg/disco), KAN – Kanamicina (30 µg/disco), SUT – Sulfadiatrim (25 µg/disco) e TET – Tetraciclina (30 µg/disco).

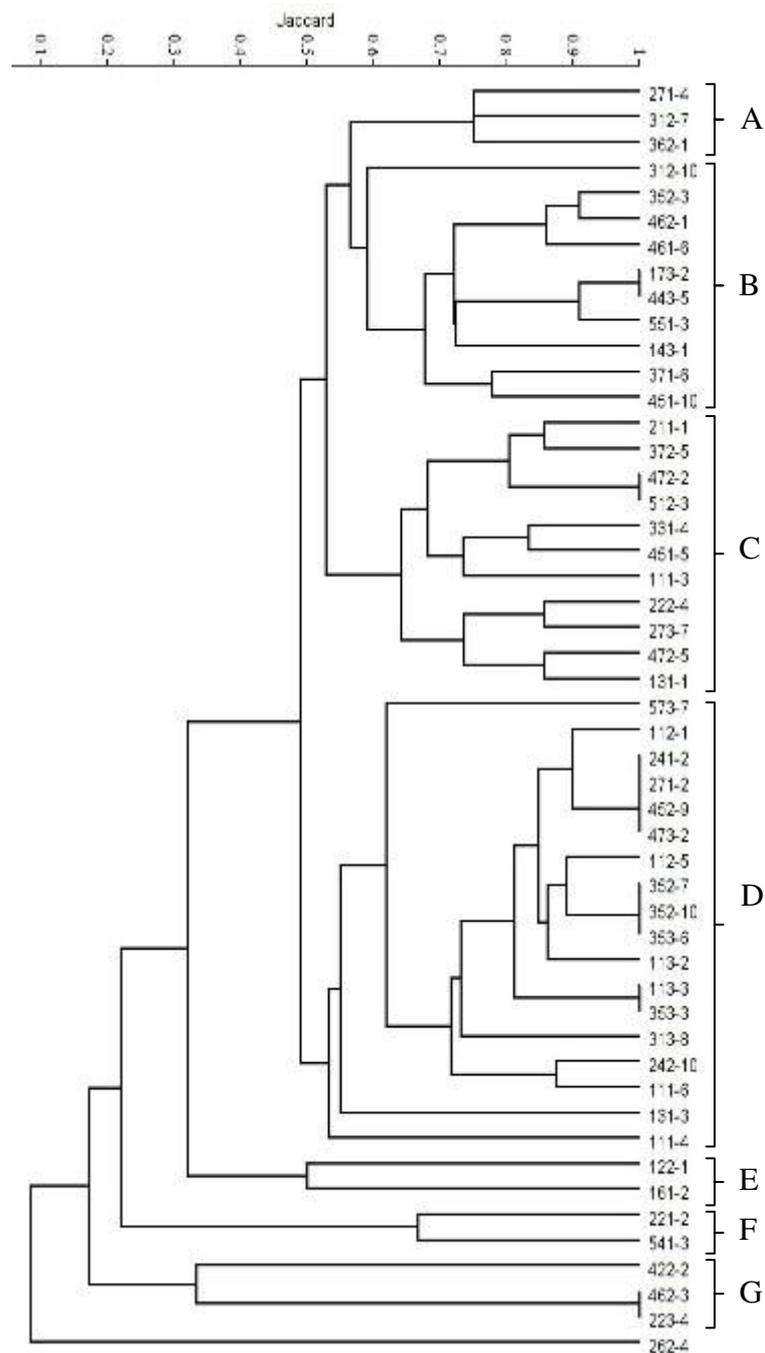


Figura 5. Dendrograma de similaridade entre bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi nativas de solos do semiárido quanto à resistência e sensibilidade a doze antibióticos.

Os grupos E e F apresentaram dois isolados cada um que geraram perfis únicos. Três isolados foram reunidos no grupo G e dois perfis de resistência foram distinguidos. Estes grupos foram formados com base na sensibilidade que isolados mostraram quando expostos

aos doze antibióticos (Tabela 3). O isolado 262-4 mostrou perfil bem diferenciado e não agrupou em nenhum dos grupos. Este isolado mostrou tolerância somente ao antibiótico kanamicina.

Tabela 3. Características dos grupos gerados com base no perfil de resistência a doze antibióticos de 50 bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi.

Grupo	N° de isolados	N° de perfis	Antibiótico*											
			AMI	AMP	CFL	CFZ	CTX	CFO	CIP	CLO	GN	KAN	SUT	TET
A	3	3	S	R	R	R	w	R	w	S	R	S	w	R
B	10	9	w	R	R	R	w	w	w	w	w	w	R	w
C	11	10	w	R	R	R	w	w	w	w	S	w	R	S
D	18	12	w	w	w	R	S	w	R	w	w	w	w	w
E	2	2	R	w	S	S	S	w	R	S	S	R	w	S
F	2	2	S	S	S	S	S	S	R	w	S	S	R	S
G	3	2	S	S	w	R	S	w	S	S	S	S	S	S
262-4	1	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

* AMI – Amicacina (30 µg/disco), AMP – Ampicilina (10 µg/disco), CFL – Cefalotina (30 µg/disco), CFZ – Cefazolina (30 µg/disco), CTX - Cefotaxima (30 µg/disco), CFO – Cefoxitina (30 µg/disco), CIP – Ciprofloxacina (5 µg/disco), CLO – Clorafenicol (30 µg/disco), GN – Gentamicina (12 µg/disco), KAN – Kanamicina (30 µg/disco), SUT – Sulfadiazol (25 µg/disco) e TET – Tetraciclina (30 µg/disco). S: sensível ao antibiótico. R: resistente ao antibiótico e “w”: resposta variável entre os isolados do grupo.

A similaridade entre os grupos variou de 34 a 75% (grupo G e A, respectivamente). O número de grupos gerados e a variabilidade de perfis dentro dos grupos revelam uma base genética diversa para tolerância a diferentes antibióticos por bactérias dos solos do semiárido que nodulam feijão-caupi (Figura 5).

O consórcio de leguminosas com poaceas com propósito de estabelecimento de pastagens para alimentação animal tem sido feito no Brasil, empregando principalmente a leguminosa estilósantes. Um programa de seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de estilósantes nestas áreas precisa considerar a resistência a antibióticos que normalmente são empregados na pecuária, para assegurar o sucesso da estirpe no campo. Neste estudo os isolados de crescimento lento mostraram ser mais resistentes aos antibióticos analisados, embora tenha ocorrido alta variabilidade de respostas entre estes, em que 18 deles mostraram 12 perfis de resistência distintos.

4.4 Uso de Diferentes Fontes de Carbono e Atividade Enzimática Avaliada Utilizando kit API20NE

Os isolados foram testados quando a habilidade em metabolizar doze fontes de carbonos de três classes químicas (carboidratos, sais orgânicos e ácidos orgânicos). Os isolados mostraram maior versatilidade para metabolizar as fontes de carbono pertencente ao grupo dos carboidratos (Figura 6), sendo que as fontes D-manose e D-manitol foram metabolizadas por todas as bactérias avaliadas. O resultado para o D-manitol era esperado, pois esta é a fonte de carbono que compõe o meio YMA utilizado para isolamento deste grupo de bactérias (VINCENT, 1970).

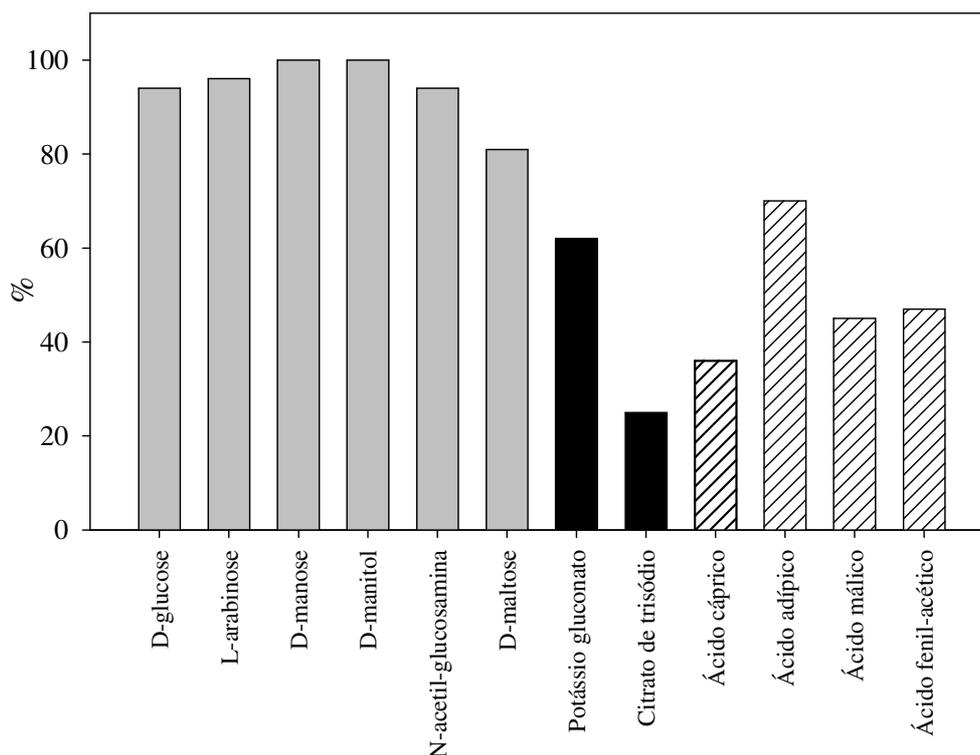


Figura 6. Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono. (As fontes de carbono de barras cinza são carboidratos, barras pretas são sais orgânicos e barras hachuradas ácidos orgânicos).

A D-maltose, dentre as fontes da classe dos carboidratos, foi a que mais limitou o crescimento dos isolados. No entanto, o percentual de isolados que metabolizaram esta fonte de carbono foi maior quando comparados com as fontes das classes dos sais e ácidos orgânicos. Fora o ácido adípico, as fontes da classe dos ácidos foram, de um modo geral, mais limitantes para o crescimento das bactérias. Fontes de carbono de natureza química ácida também foram as que mais limitaram o crescimento de bactérias isoladas de nódulos de adubo verde (SRIDHAR et al., 2005). Em estudo realizado com bactérias isoladas de nódulos de guandu, Fernandes Júnior (2009) identificou que o ácido málico e a maltose representavam as fontes de açúcar que menos foram metabolizadas.

As fontes de carbono L-arabinose, D-manose, D-manitol, e N-acetil-glucosamina foram utilizadas por todos os 34 isolados de crescimento rápido (Figura 7). As fontes de carbono que mais limitaram o crescimento deste grupo foram o ácido cáprico, ácido fenil-acético e ácido adípico. Entre os isolados de crescimento lento, as fontes D-manose e D-manitol foram as que proporcionaram crescimento de todos os isolados (18). Dos 18 isolados de crescimento lento avaliados, dois não utilizaram D-glucose e L-arabinose e nenhum utilizou o ácido cáprico. As fontes que mais restringiram o crescimento dos isolados de crescimento lento foram: citrato de trisódio, ácido adípico, potássio gluconato, ácido málico e ácido fenil-acético, sendo o ácido adípico e ácido cáprico as fontes que mais limitaram (Figura 7). Todas estas fontes de carbono não pertencentes ao grupo químico dos carboidratos, o que mostra uma maior limitação dos isolados de crescimento lento para metabolizar sais e ácidos orgânicos. Metabolizar diferentes fontes de carbono representa uma vantagem ecológica. Estirpes que possam utilizar as mais variadas formas de carbono, que a

planta secreta para a rizosfera, apresentam característica desejável para produção de inoculante, pois revela a capacidade saprofítica que podem ter para se estabelecer no solo.

A D-maltose foi a única fonte de carbono que foi, proporcionalmente, mais metabolizadas pelas bactérias de crescimento lento. Enzimas que catabolizam dissacarídeos normalmente não são comuns no metabolismo de rizóbio de crescimento lento (SADOWSKY et al., 1983). A estirpe *Azorhizobium doebereineriae* UFLA1-100^T não é hábil para utilizar a sacarose como única fonte de carbono, sendo o ácido láctico a fonte mais apropriada para crescimento desta estirpe (MOREIRA et al., 2006).

Isolados de rizóbio normalmente apresentam baixa capacidade para metabolizar fontes de carbono pertencentes ao grupo químico dos ácidos, como ácido málico (BERGE et al., 2009). Neste estudo, esta fonte de carbono foi metabolizada por 96% dos isolados de crescimento rápido.

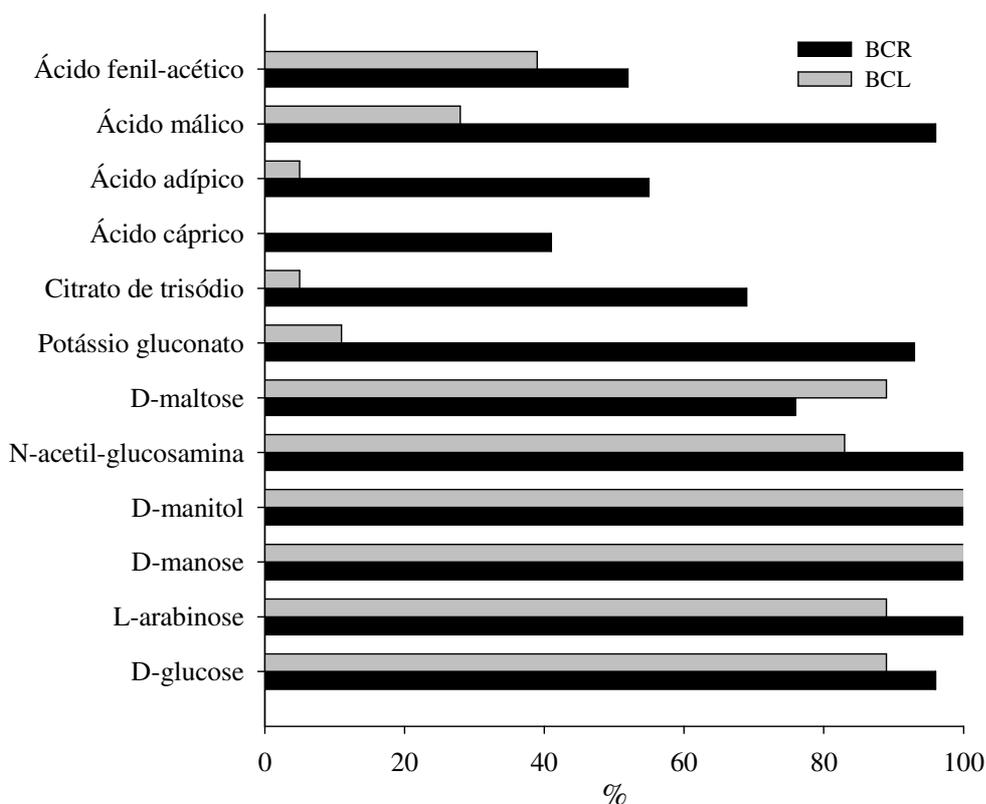


Figura 7. Percentual de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi quanto ao hábito de crescimento capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono. BCR-Bactérias de crescimento rápido. BCL-Bactéria de crescimento lento.

O índice de utilização múltipla de carbono foi de 0,83 para os isolados de crescimento rápido e 0,55 para a amostra de isolados de crescimento lento. Este resultado sugere um metabolismo mais homogêneo entre os isolados de crescimento rápido quanto à utilização de fontes de carbono e que estes apresentam vantagem ecológica para utilização do carbono em diferentes formas, apresentando maior diversidade metabólica que os isolados de crescimento lento.

Quanto à atividade enzimática, os isolados avaliados produziram 13 perfis enzimáticos (Tabela 4). Oito perfis foram produzidos exclusivamente por isolados de crescimento rápido

(B, C, D, E, F, I, K e L), quatro por isolados de crescimento lento (A, F, I e L) e um (G) por ambos os grupos de crescimento (Tabela 4). Os perfis A, B, E e J foram produzidos por somente um isolado (Figura 8).

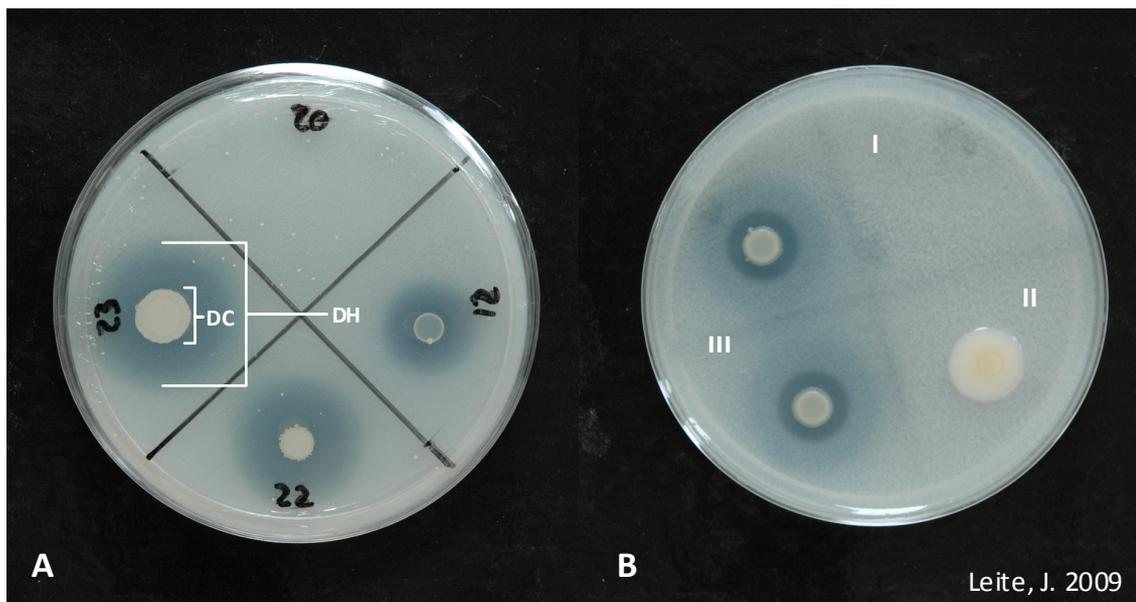
Das enzimas avaliadas como kit API20NE, a atividade da β -galactosidase foi a que mais diferenciou os grupos de crescimento. Esta enzima ocorreu unicamente entre os isolados de crescimento rápido (96% foram positivas). A atividade da enzima β -glicosidade foi mais comum entre os isolados. A hidrólise da esculina é catalizada pela atividade de β -glicosidade. Produção de β -galactosidase e β -glicosidade já foram reportada em *Rhizobium lusitanum*, isolada de nódulo de *Phaseolus vulgaris* (VALVERDE et al., 2006). A presença destas duas enzimas no metabolismo bacteriano representa uma vantagem ecológica, pois estão relacionadas ao ciclo do carbono metabolizando compostos poliméricos (DEL BEM, 2008, SOUZA et al., 2009). Todos os isolados apresentaram reação negativa para produção de indol (TRP), fermentação da glucose (GLU) e arginina dehidrolase (ADH). Para as demais enzimas os isolados tiveram respostas variáveis.

Tabela 4. Perfis de atividade enzimática identificados por API20NE em bactérias com diferentes hábitos de crescimento isoladas de nódulos de feijão-caupi.

Perfil enzimático	Número de isolados	Hábito de crescimento	Atividade enzimática*								
			NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	
A	1	L	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B	1	R	+	-	-	-	-	-	-	-	+
C	3	R	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D	2	R	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E	1	R	+	-	-	-	-	-	+	+	+
F	2	R	+	-	-	-	-	+	+	+	+
G	9	L	+	-	-	-	-	+	+	+	-
H	7	L/R	+	-	-	-	-	+	+	-	-
I	9	R	+	-	-	-	-	+	+	-	+
J	1	L	-	-	-	-	-	+	+	-	-
K	8	R	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L	4	R	-	-	-	-	-	+	+	-	+
M	2	L	+	-	-	-	-	+	-	-	-

*NO₃ – Redução de nitrato. TRP – Formação de indol (Tryptofano). GLU – Fermentação da glucose. ADH – Arginina Dehidrolase. URE – Urease. ESC – Hidrólise da esculina (β -glicosidade). GEL – Gelatinase (protease). PNPG – β -galactosidade.

Estes resultados mostram uma boa diferenciação entre bactérias de crescimento rápido e lento, isoladas de feijão-caupi, quando caracterizadas com API20NE. Embora este kit tenha sido desenvolvido para identificação de bactérias de origem clínica, ficou claro neste estudo que as bactérias de crescimento rápido e lento mostraram variabilidade de respostas aplicando-se este kit e que o teste PNPG (β -galactosidase) distinguiu bem os grupos de crescimento.



4.5 Solubilização de Fosfato de Cálcio (SFC)

Foram avaliados 50 isolados quanto à habilidade para solubilizar fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio de cultivo GL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). A capacidade de solubilização do fosfato de cálcio foi verificada pela presença de um halo transparente ao redor da colônia (Figura 8).

Figura 8. Esquema utilizado para cálculo do índice de solubilização (I.S.= Diâmetro do halo-DH/Diâmetro da colônia-DC) (A) e as três possíveis respostas (B): I – bactéria não cresce, II – bactéria cresce, mas não solubiliza e III – bactéria solubiliza o fosfato

Do total avaliado, doze foram capazes de solubilizar o fosfato de cálcio, o que representa 24% dos isolados, 10 (20%) cresceram, mas não solubilizaram o fosfato, e 28 (56%) não cresceram. A frequência de solubilizadores encontrada neste estudo foi

relativamente baixa, no entanto, esta resposta revela a presença de um mecanismo alternativo à fixação biológica de nitrogênio para promoção do crescimento de planta, traço importante para seleção de bactérias multifuncionais na produção de inoculantes.

A frequência de isolados que não cresceram no meio GL foi alta. Esta resposta negativa à solubilização pode estar associada ao fato de que estes isolados não apresentam a atividade solubilizadora ou, a glicose não seja a fonte de carbono ideal para a expressão desta característica. Influência da fonte de carbono sobre a atividade solubilizadora de fosfato de cálcio foi identificada em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (OLIVEIRA, 2009). Sridevi & Mallaiyah (2009) avaliaram o efeito de 15 fontes de carbono sobre a atividade solubilizadora em estirpes de *Rhizobium* sp isoladas de diferentes leguminosas. Os autores verificaram que as estirpes mostraram maior atividade solubilizadora quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono. A glicose também foi a melhor fonte de carbono para solubilização por estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de nódulos de *Cicer arietinum* (HALDAR et al., 1991). No entanto, no estudo de Oliveira (2009) foi verificado que de 13 isolados que não apresentaram crescimento em meio para solubilização de fosfato utilizando glicose como fonte de carbono, sete cresceram quando a fonte de carbono foi substituída por manitol, sendo que destas, duas apresentaram atividade solubilizadora e eram pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Quando analisadas sob o aspecto do hábito de crescimento, todos os isolados que solubilizaram fosfato de cálcio são de crescimento rápido (Figura 9). Este grupo de bactérias esteve presente nas três classes de resposta ao crescimento no meio de cultivo com fosfato de cálcio, mostrando a variabilidade de resposta para as condições de crescimento em meio GL. Ao passo que nenhum isolado de crescimento lento cresceu no meio.

Atividade solubilizadora de fosfato de cálcio já foi verificada tanto em bactérias de crescimento rápido como de crescimento lento isoladas de nódulos de feijão-caupi, utilizando glicose como fonte de carbono (OLIVEIRA, 2009; CHAGAS JÚNIOR et al., 2010). Embora, utilizando glicose como fonte de açúcar, foi possível revelar diferenças quanto à atividade solubilizadora entre os dois grupos de crescimento. Testes utilizando outras fontes são importantes para revelar a presença da atividade solubilizadoras nos isolados de crescimento lento.

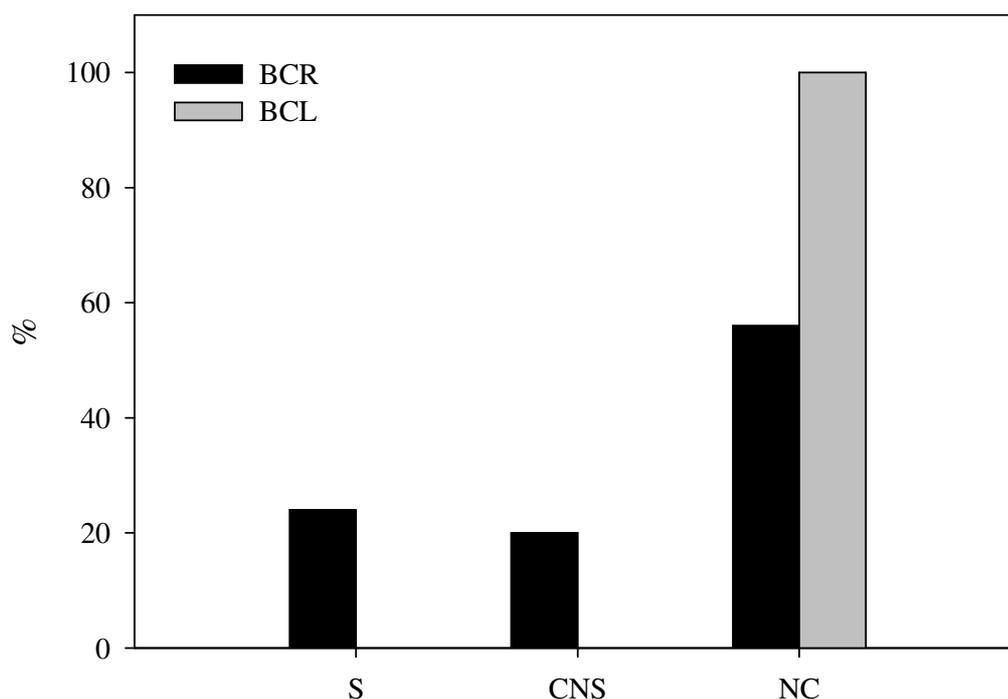


Figura 9. Percentual de bactérias de crescimento rápido (BCR) e lento (BCL) isoladas de nódulos de feijão-caupi nas diferentes classes de resposta ao crescimento em meio de cultivo com fósforo de cálcio. S – Solubilizou fosfato presente no meio, CNS – Cresceu mas não solubilizou o fosfato e NC – Não cresceu.

Hara & Oliveira (2004) classificaram rizóbios solubilizadores de fosfato de cálcio e alumínio isolados de nódulos de feijão-caupi com base no tempo que levavam para iniciar atividade de solubilização. Os autores consideraram precoce o isolado que mostrou atividade de solubilização até três dias após a inoculação no meio de cultivo e tardio os isolados com início da atividade a partir do quarto dia de inoculado em placa. Segundo esta classificação, considera-se que dos 12 isolados que apresentaram atividade solubilizadora neste estudo, onze foram precoces e um tardio (451-5) (Tabela 5).

À medida que o tempo de incubação foi aumentado, o índice de solubilização dos isolados também aumentou, sendo que na avaliação feita no 12º dia os isolados mostraram maior variabilidade de resposta. Na primeira avaliação (três dias após a inoculação) os isolados 271-4, 312-7, 312-10 e 451-10 apresentaram capacidade de solubilização classificada como média, atingindo $I.S. \geq 2$. O maior índice foi alcançado pelo isolado 312-10 aos 12 dias após a inoculação, mostrando ser promissor para testes de promoção de crescimento em plantas sob condições de fósforo pouco solúvel.

Tabela 5. Índice de solubilização e características relativas à solubilização de fosfato de cálcio em meio GL por bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi.

Isolado	Índice de solubilização (IS) ¹	Início da	Capacidade
---------	---	-----------	------------

	3° dia	6° dia	12° dia	solubilização	de solubilização
173-2	1,85bB	1,90bB	2,76cA	Precoce	Média
271-4	2,07aC	2,52aB	2,96cA	Precoce	Média
312-7	2,15aA	2,43aA	2,53dA	Precoce	Média
312-10	2,04aC	2,42aB	3,75aA	Precoce	Média
352-3	1,54bC	2,30aB	3,21bA	Precoce	Média
362-1	1,62bC	2,30aB	2,79cA	Precoce	Média
422-2	1,61bB	2,61aA	2,86cA	Precoce	Média
443-5	1,60bC	2,55aB	3,33bA	Precoce	Média
451-5	NS ²	1,74bB	2,64cA	Tardia	Média
451-10	2,00aB	2,28aB	3,04cA	Precoce	Média
462-1	1,76bA	2,05bA	2,18dA	Precoce	Média
551-3	1,82bB	1,88bB	2,48dA	Precoce	Média
Média	1,57C	2,15B	2,72A		
CV (%)	11,85				

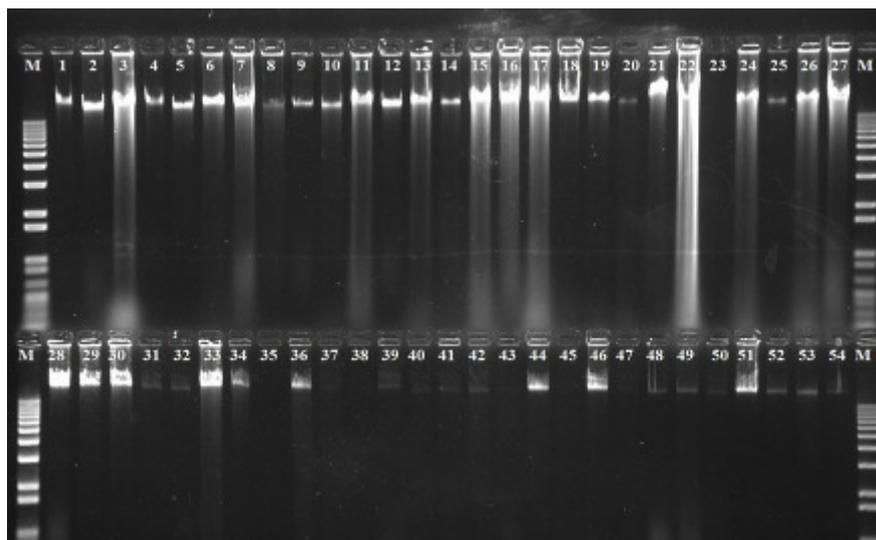
¹I.S.: diâmetro do halo (mm) /diâmetro da colônia (mm). ²NS: não solubilizou.

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral o índice de solubilização foi aumentando com o tempo de incubação (Tabela 5), o que está de acordo com os resultados obtidos por Hara & Oliveira (2004). Aos 12 dias após a inoculação, todos os isolados foram classificados como de capacidade média de solubilização. Variabilidade na eficiência de solubilização de fosfato de cálcio entre estirpes de bactérias isolados de nódulos de leguminosas também foi verificada em estudos feitos por Oliveira (2009), Hara & Oliveira (2005) e Peix et al. (2001).

4.6 Variabilidade no Tamanho do Espaço Intergênico 16S-23S rRNA

O produto da extração de DNA das bactérias caracterizadas genotipicamente nestes estudo encontra-se na **Figura 10**.



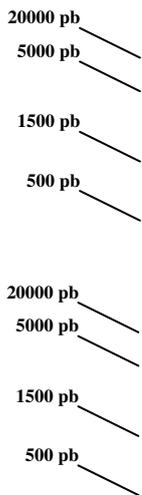


Figura 10. Produto da extração de DNA de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. M – Marcador 1 Kb plus, 1: Isolado 111-3, 2: 161-2, 3: 173-2, 4: 211-1, 5: 221-2, 6: 222-4, 7: 262-4, 8: 263-3, 9: 271-4, 10: 273-7, 11: 312-7, 12: 312-10, 13: 331-4, 14: 352-3, 15: 362-1, 16: 371-2, 17: 371-6, 18: 372-5, 19: 422-2, 20: 443-5, 21: 451-5, 22: 451-10, 23: 461-6, 24: 462-1, 25: 471-6, 26: 472-2, 27: 472-5, 38: 512-3, 29: 541-3, 30: 573-5, 31: 122-1, 32: 131-1, 33: 143-1, 34: 551-3, 35: 111-4, 36: 111-6, 37: 112-1, 38: 112-5, 39: 113-2, 40: 113-3, 41: 131-3, 42: 211-2, 43: 223-4, 44: 241-2, 45: 271-2, 46: 313-8, 47: 352-7, 48: 352-10, 49: 352-10, 50: 353-3, 51: 452-9, 52: 471-2, 53: 473-2 54: 242-10.

Empregando a técnica de ITS-PCR utilizando os iniciadores ITSf/ITSr foi possível verificar variabilidade para o comprimento do espaço intergênico 16S-23S (**Figura 11**). Doze bandas polimórficas foram identificadas entre as amostras de bactérias de crescimento rápido distinguindo claramente estes isolados, ao passo que entre os isolados de crescimento lento quatro bandas polimórficas foram identificadas. Este resultado mostra maior variabilidade para o comprimento do ITS entre os isolados de crescimento rápido.

Rizóbio de crescimento rápido mostraram maior variabilidade de sequência do ITS que rizóbio de crescimento lento em estudo feito por Tan et al. (2001). Estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de *Arachis hypogaea* L. de solos na China que mostraram alta similaridade para sequência do 16S rRNA, mostraram variabilidade para o tamanho do ITS sendo separados em três grupos (YANG et al., 2005). A variedade no comprimento do ITS também foi utilizada por Vineusa et al. (2005) para distinguir estirpes de *Bradyrhizobium* que apresentavam alta similaridade do 16S rRNA. É possível que os isolados de crescimento lento com mesmo tamanho do ITS representem a mesma espécie (Rivas et al., 2004).

Zhang et al. (2008) caracterizando estirpes de crescimento rápido e lento isoladas de nódulos de *Vigna unguiculata* e *Vigna radiata*, mostram que os 54 isolados de crescimento lento quando formaram 3 grupos genotípicos com base na análise de ARDRA, ao passo que entre os oito isolados de crescimento rápido foi encontrado cinco perfis genotípicos. Quando o ITS destes isolados foi cortado com as enzimas *MspI*, *HaeIII* and *AluI*, os isolados de crescimento lento mostraram maior variedade de perfis do ITS. Estes resultados mostram a importância da análise do ITS em estudos de filogenia de bactérias de crescimento lento que nodulam leguminosas.

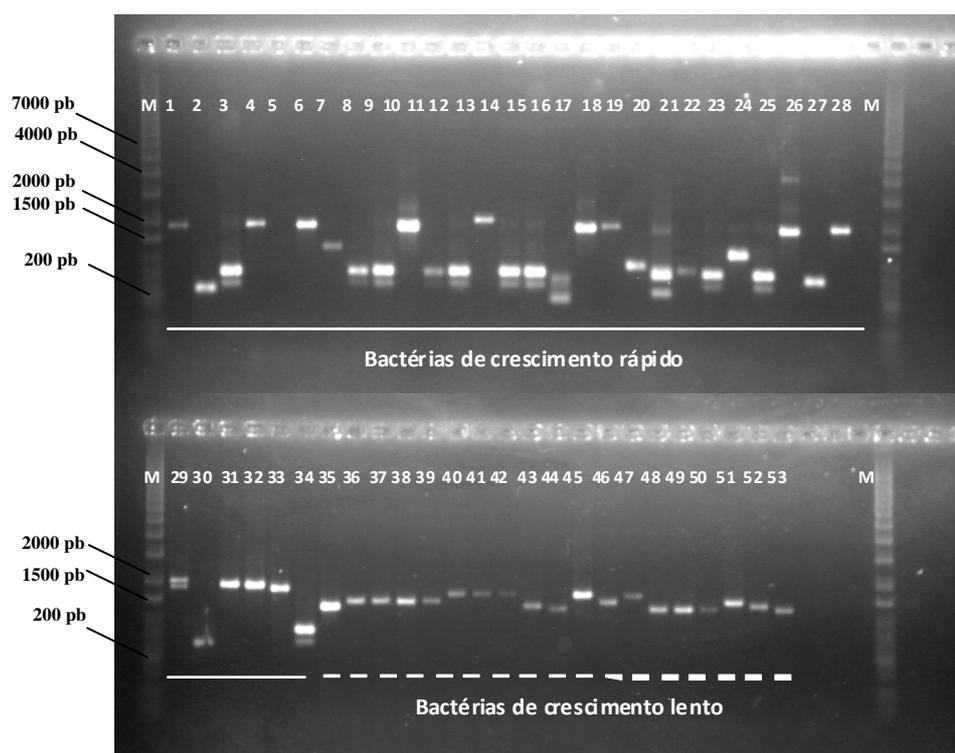


Figura 11. Produto de ITS-PCR de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. M – Marcador 1 Kb plus, 1: Isolado 111-3, 2: 161-2, 3: 173-2, 4: 211-1, 5: 221-2, 6: 222-4, 7: 262-4, 8: 263-3, 9: 271-4, 10: 273-7, 11: 312-7, 12: 312-10, 13: 331-4, 14: 352-3, 15: 362-1, 16: 371-2, 17: 371-6, 18: 372-5, 19: 422-2, 20: 443-5, 21: 451-5, 22: 451-10, 23: 461-6, 24: 462-1, 25: 471-6, 26: 472-2, 27: 472-5, 38: 512-3, 29: 541-3, 30: 573-5, 31: 122-1, 32: 131-1, 33: 143-1, 34: 551-3, 35: 111-4, 36: 111-6, 37: 112-1, 38: 112-5, 39: 113-2, 40: 113-3, 41: 131-3, 42: 211-2, 43: 223-4, 44: 241-2, 45:

271-2, 46: 313-8, 47: 352-7, 48: 352-10, 49: 352-10, 50: 353-3, 51: 452-9, 52: 471-2 e 53: 473-2.

4.7 Diversidade Genética dos Isolados Segundo Perfil de Banda Gerado pelo primer BOX

Um alto nível de polimorfismo foi verificado entre os 50 isolados caracterizados com o primer BOX 1A. Ao todo foram oito grupos genótipos que congregaram 43 perfis diferentes (Figura 12). O alto grau de similaridades entre as isolados pode ser verificada pelo baixo grau de similaridade final (20%). Os isolados foram reunidos em oito grupos genotípicos, com similaridade interna do grupo variando de 27 (grupo H) a 51 % (grupo D).

No grupo A os isolados 352-7 e 161-2 foram agrupados com as estirpes padrão de *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium (Ensifer) fredii*. O grupo B foi formado pelo isolado 262-4 e as estirpes padrão de *Cupiravidus taiwnersis* e *Bradyrhizobium elkanii*. Os grupos C e D congregaram a maioria dos isolados. No grupo C, com similaridade mínima de 42% foram agrupados 15 isolados, sendo que destes 13 eram de crescimento rápido. Os isolados 273-7 e 371-6 do sub-grupo CI apresentaram mesmo perfil e juntamente com os demais isolados similaridade de 52% com a estirpe padrão de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. O sub-grupo CII foi constituído pelo isolado 221-2 e a estirpe padrão de *Burkholderia sabiae* e o sub-grupo CIII pelos isolados 241-2, 473-2 e 451-5.

O grupo D agrupou a maioria dos isolados (22) e três estirpes padrão. Este grupo foi separado em cinco sub-grupos. O isolado 271-4 e as estirpes padrão de *Burkholderia nodosa* e *Rhizobium tropici* foram reunidos no sub-grupo DI. No sub-grupo DIII foi formado só por isolados de crescimento lento com 100% de semelhança entre si. Outros dois pares de isolados também mostraram perfil 100% similar, foram os isolados 113-3 e 271-2 de crescimento lento e os isolados 472-5 e 541-3, ambos pertencentes ao sub-grupo DIV. A estirpe padrão de *Mesorhizobium huakii* apareceu agrupada com os isolados 512-3, 111-4, 221-1 e 131-1 no sub-grupo DV.

A estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* apareceu agrupada com os isolados 551-3 e 131-3 (grupo F) e o isolado 122-1 foi agrupado com a estirpe padrão de *Azorhizobium caulinodans*. Os demais isolados apareceram em grupos com baixa similaridade com as estirpes padrão.

O BOX-PCR tem sido freqüentemente utilizado para genotipagem de bactérias a fim de revelar diferenças entre estirpes em estudos de diversidade (LU et al., 2009; KOEDOEBOEZ et al., 2009) e também empregado na identificação de estirpes utilizadas em inoculantes no Brasil, como ferramenta de controle de qualidade (INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 30, MAPA). No caso de rizóbio, bactérias que nodulam leguminosas, esta ferramenta tem sido muito empregada para fins da caracterização da diversidade deste grupo de bactérias assim como na descrição de novas espécies (HAN et al., 2008). Utilizando BOX-PCR, Florentino et al. (2010) conseguiram mostrar distinção genotípica entre nove estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos de Minas Gerais e de Rondônia. Os nove isolados produziram perfis únicos. As regiões Norte e Nordeste são as que mais cultivam o feijão-caupi. Do Nordeste há somente um relato de caracterização genotípica por BOX-PCR de rizóbio isolados de nódulos de feijão-caupi (FERNANDES et al., 2003). O sucesso desta cultura na região Nordeste está na rusticidade desta cultura para tolerar altas temperaturas e

períodos de estiagem na época de cultivo, quando comparado ao feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) (FREITE et al., 2005). Conhecer a estrutura das populações de bactérias que nodulam feijão-caupi a partir de sua base genética é muito importante para melhor conhecer a dinâmica destas populações e então poder melhor selecionar estirpes eficientes em fixar nitrogênio biologicamente.

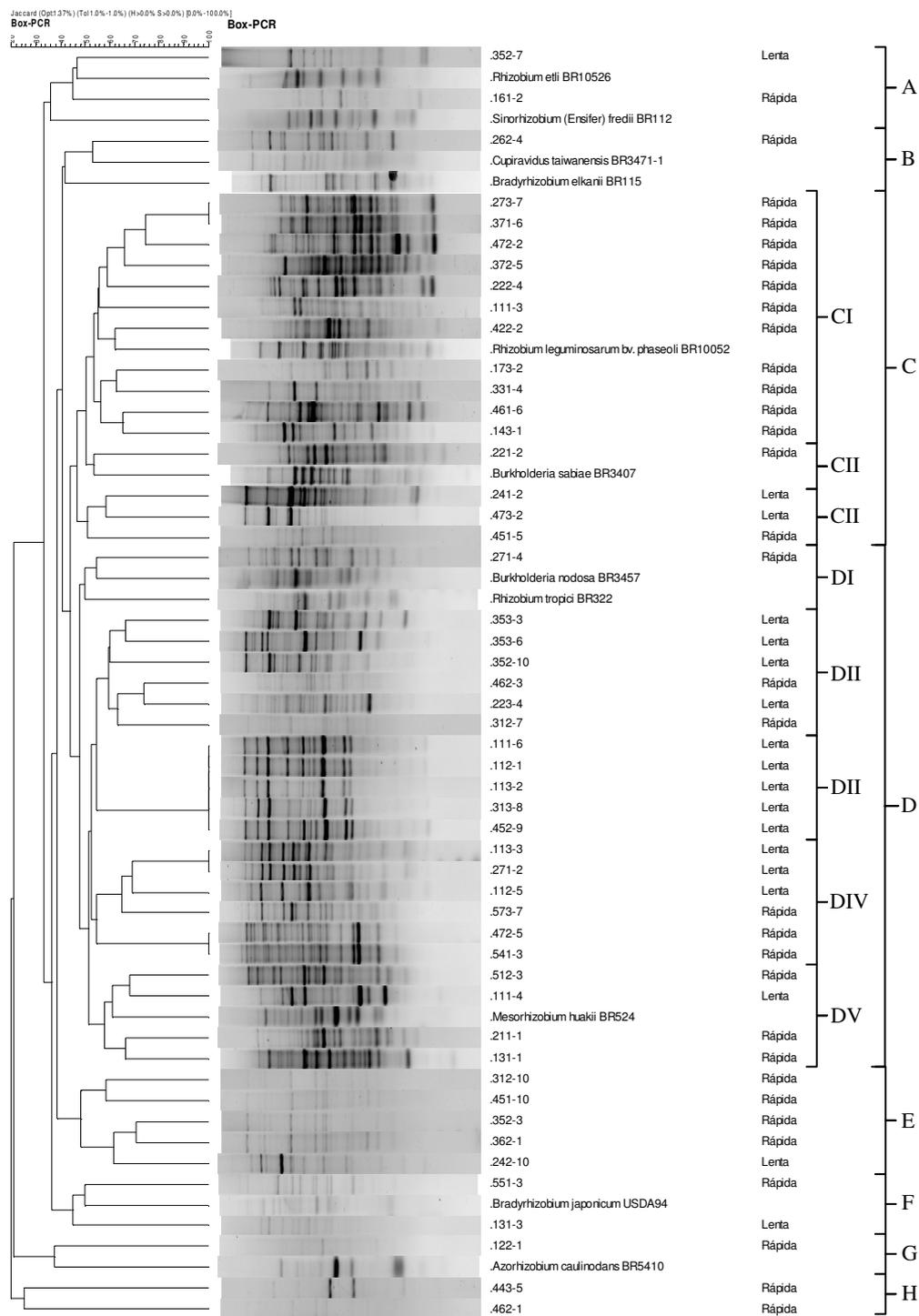


Figura 12. Dendrograma de similaridade gerado pelo fingerprinting utilizando o *primer* BOX-1A de isolados nativos de solos do semiárido brasileiro obtidos de nódulos de feijão-caupi.

5 CONCLUSÕES

Isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi em solos do semiárido brasileiro possuem ampla resposta ao estresse de temperatura e salinidade, sendo que os isolados de crescimento rápido mostraram maior variabilidade de resposta que os isolados de crescimento lento.

Os isolados de crescimento rápido mostraram maior versatilidade para à utilização de fontes de carbono e perfil enzimático mais diverso que os isolados de crescimento lento.

Doze isolados mostraram potencial biotecnológico para solubilização de fosfato, sendo que onze foram precoces para iniciar a atividade de solubilização. Nenhum isolado de crescimento lento é hábil para solubilizar fosfato.

Maior variabilidade para o comprimento do ITS foi encontrada entre os isolados de crescimento rápido.

A caracterização por BOX-PCR mostrou boa discriminação entre os isolados revelando 43 perfis distintos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ecologia de bactérias de solos do semiárido brasileiro é pouco conhecida, principalmente das bactérias que nodulam leguminosas. Este grupo de bactérias representa um recurso natural com potencial biotecnológico promissor para aplicação na agricultura via tecnologia de inoculação. O passo inicial para seleção destes organismos é por meio de estudos de ecologia, onde se faz necessário a caracterização por meio de abordagens fenotípicas e genotípicas.

Neste estudo foi possível verificar que este grupo de bactéria possui uma plasticidade fenotípica e genotípica ampla. Essa variabilidade para os caracteres analisados pode apontar para uma, também, correspondente variabilidade para eficiência da fixação biológica de nitrogênio e revelar estirpes potenciais para uso como inoculantes. Estudos de eficiência simbiótica em feijão-caupi são necessários para testar esta hipótese, também sendo necessários estudos para identificação destes isolados por meio de abordagens genotípicas de sequenciamento de sequências de genes estruturais para determinação da posição filogenética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANGELOTTI, F. ; SA, I. B. ; MELO, R. F. . Mudanças Climáticas e Desertificação no Semi-Árido brasileiro. In: ANGELOTTI, F.; SA, L. B.; MENEZES, E. A.; PELLEGRINO, G. Q. **Mudanças Climáticas e Desertificação no Semi-Árido Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009. p. 45-57.

ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 21-43.

BANGEL, E. V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 115f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BERINGER, J. E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

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

BEZERRA, R. V. **Biodiversidade e Efetividade de Rizóbios Nativos do Semiárido de Pernambuco de Caupi (*Vigna unguiculata*)**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 44–52, 2010.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp nov. isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2174-2179, 2008.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov. isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scrabella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1055-1059, 2007.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; FARIA, S. M.; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W. M.; LAESENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, p. 80-95, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: Acompanhamento brasileiro da safra de grãos 2007/2008: décimo segundo levantamento, set. 2008. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2009.

de LAJUDIE, P., WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 715–733, 1994.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W. M.; BONTEMPS, C.; CHOU, J. H.; YOUNG, J. P.W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1403-1411, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivar de feijão-caupi BRS Guariba é exportada para seis países. **Jornal de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte**, Teresina-PI, 10/2007. n°23, p. 4.

FERREIRA, D. F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)**. versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

FILGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S. dos.; HOMMA, A. K. O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, E. S. Aspectos Socioeconômicos. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A Cultura do Feijão-Caupi na Amazônia Brasileira**. RR: Embrapa Roraima, 2009. 356 p.

FRED, E. B.; WAKSMAN, A. S. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganism of the soil**. New York: Mc-Graw-Hill, 1928. 145p.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q., (Org.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa - Informação Tecnológica, 2005. 519p.

FREITAS, A. C. R.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Aumenta a produtividade do feijão-caupi na região Pré-Amazônia com a inoculação com rizóbios. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br>>. Acessado em: 14 de set. 2009.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 470-476, 2008.

FUNDO DE AMPARO A PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO. A surpreendente diversidade da Caatinga. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/>>. Acessado em: 14 de set. 2009.

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; DE LEY, D. J.; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J. P. W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 582-587, 1991.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9p. 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 28/fev/2010.

HAN, T. X.; HAN, L. L.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; GU, J. G.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Mesorhizobium gobiense* sp nov and *Mesorhizobium tarimense* sp nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2610-2618, 2008.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 667-672, 2005.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 343-357, 2004.

HÜBNER, A. P. **Identificação de bactérias diazotróficas endofíticas do grupo bacillus associadas a raízes de plantas de arroz irrigado**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 769-776, 2005.

KOEDOEBOECZ, L.; HALBRITTER, A.; MOGYOROSSY, T.; KECSKES, M. L. Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia in cropping areas under intensive and organic agriculture in Hungary. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 394-399, 2009.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, F. M. M.; ANDRADE, M. J. B. de; SOARES, A. L. de. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v. 51, p. 67-82, 2004.

LAMMEL, R. L. **Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. 2007. 116f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

LIMA, A. C.; AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. Produtos obtidos a partir da farinha de caupi. In: BRITO, E. S. **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97p.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1095-1104, 2005.

LIN, D. X.; WANG, E. T.; TANG, H.; HAN, T. X.; HE, Y. R.; GUAN, S. H.; CHEN, W. X. *Shinella kummerowiae* sp nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LIU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legume *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 465-477, 2005.

LU, Y. L.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; GUAN, S. H.; YAN, X. R.; CHEN, W. X. Genetic diversity and biogeography of rhizobia associated with Caragana species in three ecological regions of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 351-361, 2009.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa N° 30, de 12 de novembro de 2010. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 13/06/2011.

MARRA, L. M. **Fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos por bactérias isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PRADO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MARTINS, C. M.; LOUREIRO, M. F.; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp.. **Revista Agricultura Tropical**, v. 5, p. 67-79, 2001.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMAJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMAJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 1005-1110, 1997.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 235-246, 2006.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. Nova delimitação do Semiárido Brasileiro. Disponível em: <<http://www.integracao.gov.br>>. Acessado em: 14 de set. 2009.

MOREIRA, P. X.; BARBOSA, M. M.; GALLÃO, M. I.; LIMA, A. C.; AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. Estrutura e composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). In: BRITO, E. S. **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

MOTTA, J. S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas**. 2002. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 899-905, 2004.

NOUR, S. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M. P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 640-648, 1995.

OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-comum, caupi e siratro**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P. S.; SARAVANAN, V. S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp.. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 807-816, 2010.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 103-110, 2001.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ed. Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil, 1997.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia**. 2000. 93f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PONGSILP, N.; LEELAHAWONGE, C.; NUNTAGIJ, A.; TEAUMROONG, N.; BOONKERD, N. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. **Afrincan Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1307-1313, 2010.

THRALL, P. H.; BROADHURST, L. M.; HOQUE, M. S.; BAGNALL, D. J. Diversity and salt tolerance of native *Acacia* rhizobia isolated from saline and non-saline soils. **Austral Ecology**, v. 34, p. 950–963, 2009.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

REGUERA, M.; LLORET, J.; MARGARET, I.; VINARDELL, J. M.; MARTIN, M.; BUENDIA, A.; RIVILLA, R.; RUIZ-SAINZ, J. E.; BONILLA, I.; BOLANOS, L. Gene Smb21071 of plasmid pSymB is required for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and is implicated in modifications of cell surface polysaccharides structure in response to hyperosmotic stress. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1145-1152, 2009.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; KROPPESTEDT, R. M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp nov that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 47-53, 2003.

RODRIGUES, J. E. L.; ALVES, R. N.; TEIXEIRA, R. N. G.; ROSA, E. S. **Adubação NPK, na cultura do feijão-caupi em agricultura familiar, no Município de Pontas de Pedras-PA**. Bélem: Embrapa - Amazônia Oriental, 2004, 3p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 95)

ROME, S., FERNANDEZ, M. P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J. C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 972–980, 1996.

RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. **Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR 3267, recomendada como inoculante**. Searopédica: Embrapa - Agrobiologia, 2006. 16 p. (Embrapa Agrobiologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15)

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, C. E. R. E. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P. RUMJANEK, N. G.; WARDSON, L. B.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P.; MENEZES, E. A. Comportamento produtivo de caupi em regimes irrigado e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2229-2234, 2000.

SEIDO, S. L. **Validação de isolados de rizóbio obtidos de solos da região do submédio São Francisco associados a três cultivares de feijão-caupi**. 2009. 35f. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônoma). Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

SILVA, S. M. S.; MAIA, J. M.; ARAÚJO, Z. B.; FREIRE FILHO, F. R. **Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**. Teresina: Embrapa - Meio-Norte, 2002. 2p. (Embrapa Meio-Norte. Comunicado Técnico, 149).

SINIMBU, F. Safra recorde de feijão caupi no Mato Grosso. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2009>>. Acesso em: 22 jun. 2009.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônoma de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG): I - caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 765-802, 2006.

SOUZA, Carla Albuquerque de et al. Lodo de esgoto em atributos biológicos do solo e na nodulação e produção de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1319-1327, 2009.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.

SADOWSKY M. J.; KEYSER H. H., BOHLOOL B. B. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, p. 716–722, 1983.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

SWELIM, D. M.; HASHEM, F. M.; KUYKENDALL, L. D.; HEGAZI, N. I.; ABDEL-WAHAB, S. M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 224-232, 1997.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1985-1989, 2005.

VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2631-2637, 2006.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp nov and *Burkholderia phymatum* sp nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Microbios en línea. Disponível em: <www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. Acesso em : 14 de set. de 2009.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA de Microrganismos Associados a Raízes de Plantas**. Seropédica: Embrapa - Agrobiologia, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 1-9, 2007.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 386-392, 1998.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa - Roraima, 2008. 07p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 10).

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 811-818, 2006.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 281-287, 2004.

ZANG, T. W.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y. ZHOU, J. C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 201-210, 2007.

8 ANEXOS

Anexo 1. Grupos culturais dos isolados selecionados para teste de tolerância a temperatura e a salinidade.

Grupo	Número de isolados	Características culturais					Grupo	Número de isolados	Características culturais				
		Tempo de crescimento	Modificação do pH	Tamanho da colônia	Cor da colônia	Produção de muco			Tempo de crescimento	Modificação do pH	Tamanho da colônia	Cor da colônia	Produção de muco
G1	1	Lento	Alcalino	>2 mm	Amarela	Pouca	G26	5	Rápido	Neutro	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G2	11	Lento	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Muita	G27	15	Rápido	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G3	1	Rápido	Ácido	>2 mm	Branca	Muita	G28	1	Lento	Alcalino	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G4	2	Rápido*	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Muita	G29	3	Lento	Neutro	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G5	5	Rápido	Neutro	>2 mm	Branca	Muita	G30	6	Lento	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G6	4	Rápido	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Muita	G31	3	Rápido*	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Pouca
G7	2	Lento	Ácido	>2 mm	Branca	Muita	G32	4	Rápido*	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Muita
G8	5	Lento	Neutro	>2 mm	Branca	Muita	G33	6	Rápido	Ácido	1 a 2 mm	Branca	Muita
G9	2	Lento	Alcalino	>2 mm	Branca	Muita	G34	4	Lento	Ácido	1 a 2 mm	Branca	Muita
G10	9	Lento	Alcalino	1 a 2 mm	Branca	Pouca	G35	2	Rápido	Ácido	<1 mm	Amarela	Pouca
G11	9	Lento	Alcalino	1 a 2 mm	Branca	Muita	G36	3	Rápido	Ácido	>2 mm	Amarela	Pouca
G12	2	Rápido*	Neutro	<1 mm	Branca	Pouca	G37	6	Rápido	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Pouca
G13	1	Rápido*	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Pouca	G38	1	Rápido	Neutro	>2 mm	Amarela	Pouca
G14	1	Rápido*	Neutro	>2 mm	Branca	Pouca	G39	3	Rápido	Neutro	1 a 2 mm	Amarela	Pouca
G15	2	Rápido	Neutro	>2 mm	Branca	Pouca	G40	1	Lento	Ácido	<1 mm	Amarela	Pouca
G16	2	Lento	Neutro	>2 mm	Branca	Pouca	G41	2	Lento	Ácido	1 a 2 mm	Amarela	Pouca
G17	4	Rápido	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Pouca	G42	2	Lento	Neutro	1 a 2 mm	Amarela	Pouca
G18	7	Lento	Neutro	1 a 2 mm	Branca	Pouca	G43	2	Rápido	Ácido	<1 mm	Branca	Pouca
G19	3	Lento	Neutro	<1 mm	Branca	Pouca	G44	3	Rápido	Ácido	>2 mm	Branca	Muita
G20	3	Lento	Neutro	>2 mm	Branca	Muita	G45	4	Rápido	Ácido	>2 mm	Branca	Pouca
G21	20	Rápido	Ácido	>2 mm	Amarela	Muita	G46	1	Lento	Ácido	>2 mm	Branca	Pouca
G22	1	Lento	Ácido	>2 mm	Amarela	Muita	G47	1	Lento	Ácido	1 a 2 mm	Branca	Pouca
G23	1	Rápido*	Ácido	>2 mm	Amarela	Muita	G48	1	Rápido*	Ácido	>2 mm	Branca	Pouca
G24	7	Rápido	Ácido	>2 mm	Branca	Muita	G49	2	Rápido*	Ácido	>2 mm	Branca	Muita
G25	3	Rápido	Neutro	>2 mm	Amarela	Muita	Total	189	isolados				

*Estes grupos foram classificados por Leite et al. (2009) como sendo de crescimento rápido. Os isolados pertencentes a estes grupos apresentaram crescimento até 4 dias após a incubação. Neste estudo estes isolados foram considerados como sendo de crescimento rápido seguindo a caracterização de Vicente (1940).

Anexo 2. Isolados selecionados com base no perfil de tolerância a temperatura e a salinidade para testes fenotípicos e genotípicos

Isolado	Perfil de tolerância a temperatura e salinidade		Características culturais				
	°C	NaCl (%)	Tempo de crescimento	Modificação do pH	Tamanho da colônia	Cor da colônia	Produção de muco
111-3	39	0	Rápido	Ácido	>2	Amarela	Pouco
111-4	45	0	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Pouco
111-6	45	0	Lento	Neutro	1 a 2	Branca	Muito
112-1	45	0	Lento	Neutro	1 a 2	Branca	Muito
112-5	39	0	Lento	Neutro	1 a 2	Amarela	Muito
113-2	45	0	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Pouco
113-3	45	0	Lento	Ácido	1 a 2	Branca	Pouco
122-1	39	0	Rápido	Neutro	<1	Branca	Pouco
131-1	45	1	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
131-3	43	0	Lento	Neutro	1 a 2	Branca	Muito
143-1	45	1	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Pouco
161-2	39	3	Rápido	Ácido	>2	Amarela	Muito
173-2	45	3	Rápido	Neutro	1 a 2	Branca	Muito
211-1	45	2	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
221-2	45	0	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Muito
222-4	41	3	Rápido	Ácido	>2	Amarela	Muito
223-4	39	1	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Muito
241-2	41	0	Lento	Neutro	1 a 2	Branca	Muito
242-10	43	0	Lento	Ácido	1 a 2	Branca	Muito
262-4	45	2	Rápido	Ácido	1 a 2	Branca	Muito
271-2	45	0	Lento	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
271-4	41	1	Rápido	Neutro	1 a 2	Amarela	Muito
273-7	45	3	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
312-10	45	2	Rápido	Alcalino	1 a 2	Amarela	Muito
312-7	45	2	Rápido	Neutro	1 a 2	Amarela	Muito
313-8	43	1	Lento	Alcalino	<1	Branca	Pouco
331-4	41	1	Rápido	Ácido	1 a 2	Branca	Pouco
352-3	45	2	Rápido	Neutro	>2	Branca	Muito
352-7	43	0	Rápido	Ácido	>2	Branca	Pouco
352-10	41	0	Lento	Neutro	<1	Branca	Pouco
353-3	45	2	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Muito
353-6	43	2	Lento	Ácido	1 a 2	Amarela	Pouco
362-1	39	2	Rápido	Neutro	1 a 2	Amarela	Muito
371-6	45	2	Rápido	Ácido	>2	Amarela	Muito
372-5	43	1	Rápido	Ácido	1 a 2	Branca	Muito

Anexo 2. Isolados selecionados com base no perfil de tolerância a temperatura e a salinidade para testes fenotípicos e genotípicos. (continuação...)

Isolado	Perfil de tolerância a temperatura e salinidade		Características culturais				
	°C	NaCl (%)	Tempo de crescimento	Modificação do pH	Tamanho da colônia	Cor da colônia	Produção de muco
422-2	45	2	Rápido	Neutro	1 a 2	Branca	Pouco
443-5	45	5	Rápido	Neutro	>2	Amarela	Muito
451-10	45	3	Rápido	Neutro	>2	Amarela	Muito
451-5	41	0	Rápido	Ácido	1 a 2	Branca	Muito
452-9	45	0	Lento	Neutro	<1	Branca	Pouco
461-6	39	1	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Pouco
462-1	43	2	Rápido	Ácido	>2	Branca	Muito
462-3	41	3	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
472-2	43	3	Rápido	Neutro	>2	Amarela	Muito
472-5	45	3	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Muito
473-2	41	1	Lento	Alcalino	1 a 2	Branca	Muito
512-3	41	1	Rápido	Ácido	>2	Amarela	Muito
541-3	41	0	Rápido	Ácido	1 a 2	Amarela	Pouco
551-3	41	0	Rápido	Ácido	1 a 2	Branca	Muito
573-7	39	2	Rápido	Ácido	>2	Branca	Muito

Anexo 3. Perfil API 20NE para atividade enzimática e de utilização de carbono. Sinal “+” indica presença da atividade enzimática e capacidade para utilização da fonte de carbono*.

Isolado	Atividade enzimática								Fontes de carbono											
	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
	Rápidos																			
111-3	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
122-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
131-1	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
143-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
161-2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
173-2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
211-1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
221-2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
222-4	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
262-4	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
271-4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
273-7	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
312-7	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
312-10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
331-4	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
352-3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
362-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
371-6	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
372-5	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
422-2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
443-5	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
451-5	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
451-10	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
461-6	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
462-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
462-3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

Anexo 3. Perfil API 20NE para atividade enzimática e de utilização de carbono. Sinal “+” indica presença da atividade enzimática e capacidade para utilização da fonte de carbono*. (continuação...)

Isolado	Atividade enzimática								Fontes de carbono											
	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
Rápidos																				
472-2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
472-5	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
512-3	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
541-3	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
551-3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
573-7	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Lentos																				
111-4	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
111-6	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
112-1	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
112-5	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
113-2	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
113-3	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
131-3	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
223-4	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
241-2	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
242-10	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
271-2	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
313-8	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
353-3	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
352-7	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
352-10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
353-6	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
452-9	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
473-2	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-

* NO₃ – Redução de nitrato. TRP – Formação de indol (Tryptofano). GLU – Fermentação da glucose. ADH – Arginina Dehidrolase. URE – Urease. ESC – Hidrolise da esculina (β-glicosidase). GEL – Gelatinase (protease). PNPG – β-galactosidade. GLU – D-glucose. ARA – L-arabinose. MNE – D-manose. MAN – D-manitol. NAG- N-acetil-glucosamina. MAL – D-maltose. GNT – Potássio gluconato. CAP – Ácido cáprico. ADI – Ácido adípico. MLT – Ácido málico. CIT – Citrato de trisódio. PAC – Ácido fenil-acético.

Anexo 4. Perfis de resistência a doze antibióticos por bactérias de crescimento rápido de lento, isoladas de nódulos de feijão-caupi.

Isolado	Antibiótico											
	AMI	AMP	CFL	CFZ	CTX	CFO	CIP	CLO	GN	KAN	SUT	TET
	Rápidos											
111-3	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
122-1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
131-1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
143-1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
161-2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
173-2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
211-1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
221-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
222-4	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
262-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
271-4	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
273-7	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
312-7	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
312-10	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
331-4	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
352-3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
362-1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
371-6	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
372-5	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
422-2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
443-5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
451-5	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
451-10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
461-6	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
462-1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
462-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 4. Perfis de resistência a doze antibióticos por bactérias de crescimento rápido de lento, isoladas de nódulos de feijão-caupi. (continuação...)

Isolado	Antibiótico											
	AMI	AMP	CFL	CFZ	CTX	CFO	CIP	CLO	GN	KAN	SUT	TET
Rápidos												
472-2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
472-5	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
512-3	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
541-3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
551-3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
573-7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Lentos												
111-4	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
111-6	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
112-1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
112-5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
113-2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
113-3	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
131-3	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0
223-4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
241-2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
242-10	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
271-2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
313-8	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
352-7	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
352-10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
353-3	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
353-6	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
452-9	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
473-2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

*AMI – Amicacina (30 µg/disco), AMP – Ampicilina (10 µg/disco), CFL – Cefalotina (30 µg/disco), CFZ – Cefazolina (30 µg/disco), CTX - Cefotaxima (30 µg/disco), CFO – Cefoxitina (30 µg/disco), CIP – Ciprofloxacina (5 µg/disco), CLO – Clorafenicol (30 µg/disco), GN – Gentamicina (12 µg/disco), KAN – Kanamicina (30 µg/disco), SUT – Sulfadiazol (25 µg/disco) e TET – Tetraciclina (30 µg/disco).