

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS NATIVAS DE SOLO DO SEMIÁRIDO ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI

Juliani Barbosa de Sousa¹, Marcelo de Sousa Pinheiro², Leandro Lopes Silva³,
Suzana Cláudia Silveira Martins⁴, Claudia Miranda Martins⁴

¹Mestranda em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará

²Doutorando em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará

³Bolsista de Iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará

⁴Professora do Departamento de Biologia da Universidade do Ceará, Fortaleza-Ceará (claudia.miranda.martins@gmail.com)

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O feijão-caupi possui grande importância no semiárido sendo cultivado principalmente pelos pequenos agricultores em condições estressantes e utilizando tecnologias de baixo custo. Com o uso da Fixação Biológica de Nitrogênio pode-se aumentar a produtividade da cultura, sendo que a eficiência da fixação varia de acordo com a espécie, a cultivar e o uso de inoculantes adaptados para os estresses ambientais e do solo. O objetivo desse trabalho foi avaliar as características culturais de rizóbios nativos do solo oriundo da região semiárida localizado no município de Pentecoste (CE) e testá-los com relação à resistência a temperatura, pH e antibióticos. Foram testados 37 isolados e oito estirpes padrão, que apresentaram variabilidade na caracterização cultural quanto à consistência do muco e diâmetro da colônia, apenas um isolado foi de crescimento rápido e dois acidificaram o meio. Nos testes *in vitro* 59% das estirpes foram resistentes as duas faixas de pH testados, 81% cresceram até a temperatura de 45° C e seis resistiram a 14 dos antibióticos testados. Os isolados denominados LAMAB 42 e LAMAB 48 destacaram-se por apresentarem melhor desempenho em todas as características avaliadas.

PALAVRAS-CHAVE: Características fenotípicas, Fixação Biológica de Nitrogênio, Rizóbio.

CHARACTERIZATION OF NATIVE SOIL BACTERIA ISOLATED FROM COWPEA NODULES IN SEMI-ARID

ABSTRACT

Cowpea has great importance in semiarid being grown mainly by smallholders on stressful conditions and using low cost technologies. Using the Biological Nitrogen Fixation can increase crop yield, and the efficiency of fixation will vary with the species, the cultivar and the use of inoculants adapted to environmental stresses and soil. The aim of this study was to evaluate the cultural characteristics of rhizobia soil derived from the semi-arid region located in the municipality of Pentecost (EC) and test them for resistance to temperature, pH and antibiotics. Thirty seven isolates and eight patterns were tested, which showed variability in cultural characterization as to the consistency of mucus and colony diameter, only one strain was isolated from rapid growth and two acidified medium. In *in vitro* tests 59% of both strains were resistant pH ranges tested, 81% were grown to 45 ° C and six were resistant to

fourteen antibiotics. Isolates called LAMAB 48 and LAMAB 42 stood out for having the best performance in all evaluated characteristics.

KEYWORDS: Phenotypic characteristics, Biological Nitrogen Fixation, Rhizobia

INTRODUÇÃO

O uso constante da adubação nitrogenada na agricultura está promovendo um aumento de insumos nitrogenados na superfície terrestre afetando o ciclo biogeoquímico do elemento. Estima-se que a influência antrópica aumentou em até 320% a quantidade de nitrogênio na superfície terrestre (VITOUSEK et al., 2013), o uso da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma alternativa a adubação nitrogenada, sendo mais barato e causando menos impactos ambientais.

O feijão-caupi possui grande importância no semiárido sendo cultivado principalmente pelos pequenos agricultores em condições estressantes e usando tecnologias de baixo custo. Com o uso da FBN pode-se aumentar a produtividade da cultura, sendo que a eficiência da fixação varia de acordo com a espécie, a cultivar e o uso de inoculantes adaptados para os estresses ambientais e do solo (FERNANDES JÚNIOR & REIS, 2008; ZILLI et al., 2011; MARINHO et al., 2014).

A análise das características culturais é usada como uma diferenciação e triagem inicial das bactérias (GUIMARÃES et al., 2012; BARAÚNA et al., 2014), envolve a avaliação de parâmetros como o tempo em que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor, a produção de ácido e alcali, dentre outros (SANTOS et al., 2007).

Alguns fatores do solo, como pH ácido, influenciam o crescimento da planta e o processo de infecção, sendo que poucas estirpes sobrevivem abaixo do pH 4,5 (MOHAMMADI et al., 2012), esse fato pode ser contornado utilizando estirpes tolerantes que aumentam a FBN em solos ácidos (HARA & OLIVEIRA, 2005).

A FBN é um processo enzimático influenciado pela temperatura, onde a eficiência da fixação aumenta com a variação de temperatura até um máximo para depois diminuir (GUNDALE et al., 2012), esse fator também restringe a nodulação, sendo que em biomas com climas quentes há um maior número de organismos de vida livre (REED et al., 2011). A seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis às temperaturas elevadas da região semiárida amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento da bactéria na associação com o feijão-caupi, aumentando a produtividade de grãos (XAVIER et al., 2007).

Uma maior resistência a antibióticos está relacionada com características desejáveis em estirpes de rizóbio, como a eficiência simbiótica e a capacidade de sobrevivência no solo (XAVIER et al., 1998; FERNANDES et al., 2003), essa resistência intrínseca a antibióticos também vem sendo usada em estudos ecológicos para determinar heterogeneidade de espécies (SINGH et al., 2013).

O conhecimento da diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam o feijão-caupi, por meio da caracterização fenotípica é o passo inicial para a seleção de estirpes eficientes para a produção de inoculantes. O objetivo desse trabalho foi caracterizar fenotipicamente rizóbios nativos do solo oriundo da região semiárida do município de Pentecoste (CE) e avaliá-los com relação à tolerância à pH extremos, altas temperaturas e resistência intrínseca a antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

As amostras de solo foram coletadas na região semiárida do Ceará no município de Pentecoste (3°47'S a 39°16'W). A profundidade da amostragem foi de 0-20 cm, sendo os pontos de coleta obtidos de forma aleatória.

Isolamento, purificação e caracterização das colônias

A planta-isca utilizada foi o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cv “setentão”, o plantio foi feito em vasos de 300 mL adotando-se três repetições. Antes do plantio as sementes foram desinfestadas, por imersão em etanol 95% durante 30 segundos, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio (5% por 5 minutos), e logo após, lavadas seis vezes em água destilada esterilizada. Efetuou-se o plantio de três sementes por vaso, e após sete dias do plantio foi realizado o desbaste deixando uma planta por vaso.

Após 40 dias os nódulos foram coletados, espremidos e estriados em placas de Petri com meio YMA (VINCENT, 1970) com corante vermelho congo, usado para diferenciar colônias de rizóbios através do contraste de cor. Após o isolamento foi realizada a caracterização cultural, em meio YMA com corante azul de bromotimol, observando tempo de crescimento, alteração do pH do meio, diâmetro e cor da colônia, tipo de borda, consistência e elasticidade do muco dos isolados.

Autenticação dos isolados

Os isolados foram submetidos a teste de autenticidade mediante plantio e inoculação de isolados em feijão-caupi. Foi preparado um substrato composto por areia e vermiculita na proporção de 2:1 sendo o mesmo esterilizado em autoclave a 121°C durante uma hora. O plantio foi feito em vasos de 300 mL adotando-se três repetições por isolados e usando sementes de feijão-caupi cv. setentão. Antes do plantio as sementes foram desinfestadas, por imersão em etanol 95% durante 30 segundos, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio (5% por 5 minutos), e logo após, lavadas seis vezes em água destilada esterilizada.

Efetuuou-se o plantio de três sementes por vaso, e após sete dias do plantio foi realizado o desbaste deixando uma planta por vaso. Para preparo do inóculo adicionou-se 100 mL do meio YM em erlenmeyer que em seguida recebeu uma colônia pura ficando sob agitação orbital a 150 rpm por três a seis dias até haver crescimento da cultura, percebido pelo turvamento do meio.

Após três dias do plantio foram aplicados 3 mL do inóculo por planta e após 35 dias do plantio foi verificado a formação de nódulos radiculares e a presença de leghemoglobina no interior do nódulo, que indica atividade da enzima nitrogenase. As estirpes após confirmação da autenticidade foram incorporadas a coleção de culturas de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

pH

A capacidade das estirpes em tolerar valores extremos de pH foi feito em triplicata, para cada estirpe em meio YM (VINCENT, 1970) modificado para pH 4 com adição de HCl e pH 10 com adição de NaOH. As estirpes foram submetidas a

agitação a 150 rpm em temperatura ambiente. A análise de crescimento foi feita sete dias após a incubação. Tubos que apresentaram turbidez no caldo, em comparação ao controle negativo, foram considerados como resultado positivo e os que não apresentaram turbidez como resultado negativo.

Temperatura

A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi determinada submetendo as estirpes a temperaturas de 39, 41, 43 e 45 °C em meio de cultura YMA em incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD). Os testes foram realizados em triplicatas e o crescimento avaliado após sete dias. As estirpes que apresentaram crescimento foram consideradas positivas, as que não cresceram foram consideradas negativas.

Resistência a antibióticos

O antibiograma foi executado com os antibióticos Amicacina (AMI 30), Amoxicilina (AMC 30), Ampicilina (AMP10), Aztreonam (ATM 30), Cefalotina (CFL 30), Cefepime (CPM 30), Cefoxitina (CFO 30), Ceftadizima (CAZ 30), Ceftriaxona (CRO 30), Ciprofloxacina (CIP 05), Cloranfenicol (CLO 30), Gentamicina (GEN 10), Piperacilina (PIT 110), Sulfazotrim (SUT 25), Tetraciclina (TET 30), específicos para bactérias Gram-negativas. As estirpes foram inoculadas em placas com meio TY (BERINGER, 1974) onde se adicionou 100 µL de caldo YM espalhado sobre o meio, depositando-se um disco impregnado com antibiótico no centro da placa, em seguida as placas foram incubadas em B.O.D. durante sete dias. As estirpes foram classificadas como resistentes, intermediárias e sensíveis aos antibióticos de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante quanto ao halo de inibição.

Adotou-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method) e coeficiente de Jaccard para a construção da matriz de similaridade usada na elaboração do dendrograma. Os testes “in vitro” foram todos feitos em triplicata, utilizou-se oito estirpes padrões como referência em todos os testes, BR 3471 (*Cupriavidus taiwanensis*), BR 3486 (*Burkholderia phymatum*), INPA 03-11B-*Bradyrhizobium elkanii* (BR 3301), UFLA 03-84-*Bradyrhizobium* sp (BR 3302), BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp), BR 3262 (*Bradyrhizobium* sp), BR 2003 e BR 2801 (*Bradyrhizobium elkanii*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização cultural das colônias isoladas

Na caracterização cultural de 45 isolados observou-se o predomínio de bactérias que alcalinizaram o meio, apresentando consistência viscosa, diâmetro maior que 2 mm e cor branca. Apenas dois isolados apresentaram característica de crescimento rápido, com colônias maiores que 2 mm, cor amarela, acidificantes e consistência butírica. Todos os isolados apresentaram muco, e não observou-se características como consistência seca ou borda irregular.

Bactérias que nodulam feijão-caupi são predominantemente estirpes semelhantes as espécies do gênero *Bradyrhizobium* de crescimento lento e caráter alcalinizante (MELLONI et al., 2006), como as encontradas, porém em regiões áridas são obtidas principalmente estirpes de crescimento rápido que acidificam o

meio (RUIZ-DÍEZ et al., 2012; PEREIRA DE LYRA et al., 2013). Nos resultados do presente estudo foram obtidos 97% de isolados de crescimento lento e 64% alcalinizaram o meio, RUIZ-DÍEZ et al. (2012) afirmaram que o tipo de solo e a ação antrópica influencia nas características das cepas predominantes, o que pode explicar essa diferença de resultados.

Comparando os isolados de rizóbio com as estirpes padrão percebe-se uma similaridade de características culturais de rizóbio, com predomínio de colônias brancas, alcalinizantes e diâmetro maior que 2 mm. A única divergência foi na consistência do muco, nas estirpes padrão foi igualmente representada por colônias de consistência viscosa e butírica enquanto que nos isolados houve um predomínio de colônias com consistência butírica. Dos 45 isolados obtidos 37 foram autenticados como estirpes de rizóbio.

Com os resultados obtidos foi gerado um dendrograma (Figura 1) onde a 68% de similaridade formaram-se nove grupos. O grupo I contém um isolado, o único de crescimento lento que acidificou o meio. As bactérias presentes no grupo III, um isolado e uma estirpe padrão, também acidificaram o meio, porém apresentam crescimento rápido. Os grupos VIII e IX apresentam estirpes com reação do pH do meio neutra, e a consistência do muco dividida entre viscosa e gomosa. Apenas os grupos I, II e III apresentaram estirpes com a cor da colônia amarela.

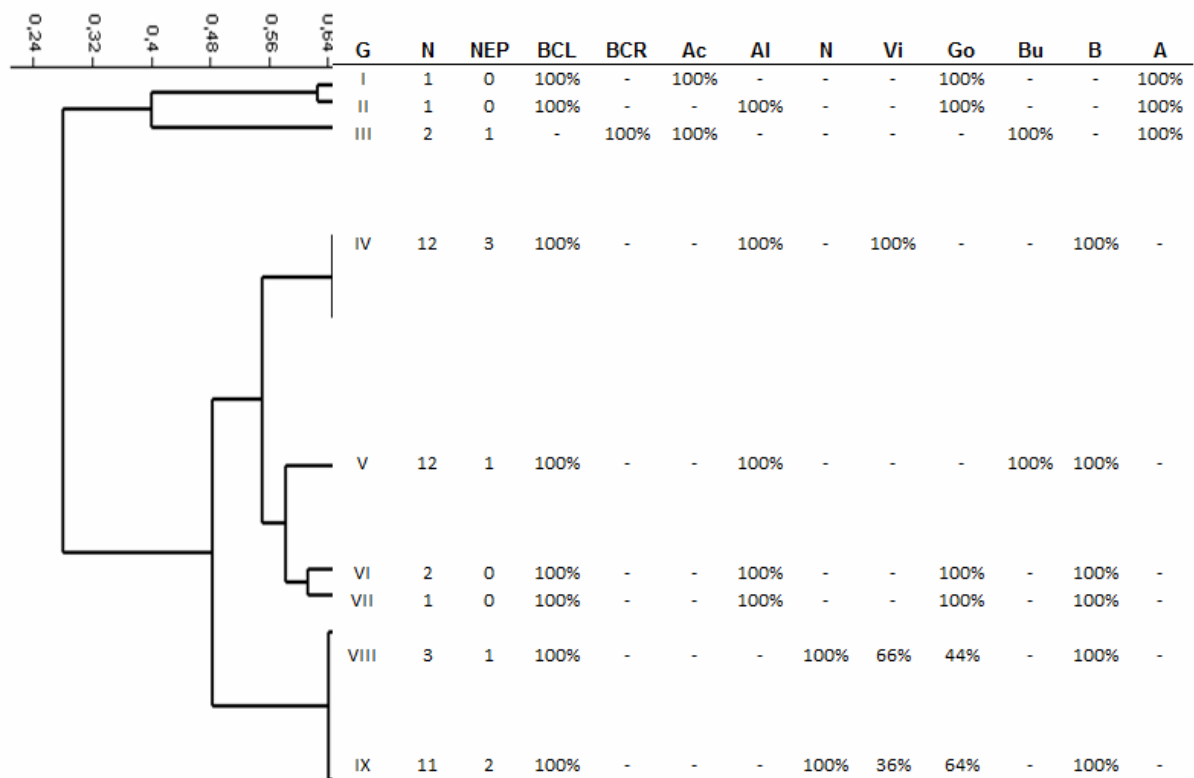


FIGURA 1: Dendrograma de caracterização cultural, gerado a partir do agrupamento de 37 estirpes oriundas de solo do semiárido isoladas de nódulos de feijão-caupi e oito estirpes padrões BR 3471, BR 3486, BR 3301, BR 3302, BR 3267, BR 3262, BR 2003 e BR 2801, método de agrupamento UPGMA usando o coeficiente de Jaccard. (G) grupo referente, (N) número de estirpes que compõem o grupo, (NEP) número de estirpes padrões, (BCL) bactérias de crescimento lento, (BCR) bactérias de crescimento rápido, (Ac) percentagem de estirpes que acidificam o meio, (Al) percentagem de estirpes que alcalinizam o meio, (N) percentagem de estirpes que mantém o meio neutro, (Vi) consistência viscosa, (Go) consistência gomosa, (Bu) consistência butírica, (B) colônias brancas e (A) colônias amarelas.

Resistência a diferentes estresses abióticos

Apenas a estirpe LAMAB 63 não apresentou crescimento em nenhum dos valores de pH testados (Tabela 1), 67% foram resistentes ao pH 4 enquanto que 96% foram resistentes ao pH 10, vários autores relatam crescimento de rizóbios na faixa entre pH 5 (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2014) e pH 9 (RUIZ-DÍEZ et al., 2012; COSTA et al., 2014). Estirpes tolerantes a baixo pH *in vitro* possuem melhor sobrevivência em solos ácidos (INDRASUMUNAR et al., 2012), e também podem apresentar um melhor nodulação e desempenho simbiótico (INDRASUMUNAR et al., 2011).

A faixa de temperatura considerada ótima para o crescimento de rizóbio é de 28-30°C, altas temperaturas inibem a atividade das enzimas nódulo glutamina sintetase, dependente de NADH glutamato sintase e a enzima nitrogenase afetando a fixação simbiótica de N₂ (HUNGRIA & KASCHUK, 2014). Do total de 37 estirpes analisadas, apenas três padrões não cresceram a 39°C (BR 2801, BR 2003, BR 3262), a porcentagem de bactérias tolerantes diminuiu medida que o estresse aumenta, sendo que a 45°C sete estirpes (LAMAB 30, LAMAB 44, LAMAB 45, LAMAB 50, LAMAB 55, LAMAB 58, LAMAB 67) e seis estirpes padrão (BR 2801, BR 3301, BR 3471, BR 2003, BR 3262, BR 3486) mostraram sensibilidade a temperatura e 32 foram resistentes (Tabela 1).

Esse alto percentual de estirpes resistentes (71,11%) pode estar relacionado com o local de origem sendo uma adaptação as pressões específicas do ambiente, também pode indicar que estas estirpes poderiam sobreviver a temperaturas mais altas, já que na literatura há relatos que estirpes de rizóbio que sobrevivem até a 50°C (BOUKHATEM et al., 2012)

As estirpes de rizóbio LAMAB 42, LAMAB 44, LAMAB 46, LAMAB 48, LAMAB 56 e LAMAB 58 apresentaram resistência a 14 antibióticos, as estirpes LAMAB 48 e LAMAB 58 foram sensíveis a amicacina, e as demais a amoxicilina. Apenas a estirpe padrão BR 3486 foi sensível ao antibiótico aztreonam enquanto que ao antibiótico cefoxitina 16 estirpes e somente uma estirpe padrão BR 3302 mostraram resistência. Ao avaliarem 28 estirpes provenientes de região semiárida de Cascavel (CE) PINHEIRO et al. (2014) observaram somente uma estirpe capaz de resistir a 14 dos mesmos antibióticos testados no presente estudo.

Normalmente os rizóbios apresentam sensibilidade ao clorafenicol (CEVHERI et al., 2011; FERNANDES JUNIOR et al., 2012), porém 93% das estirpes apresentaram resistência a esse antibiótico. As estirpes de crescimento rápido apresentaram baixa tolerância a antibióticos, incluindo a BR 3486, que resistiu apenas a dois antibióticos, sulfazotrim e cefalotina.

Actinobactérias oriundas de solos de cerrado foram capazes de causar antagonismo em algumas estirpes de rizóbios para soja, chegando a 20,3% a porcentagem destes sobre a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 33 e valores menores para outras estirpes (PEREIRA et al., 1999). Tal comportamento mostra a importância de se verificar a resistência dos rizóbios aos antibióticos tendo em vista a presença destes naturalmente no solo. A produção de muco altera a permeabilidade das células tornando as estirpes mais resistentes a fatores bióticos de competição no solo, como resistência a temperaturas elevadas, a salinidade e a presença de micro-organismos produtores de antibiótico (SANTOS et al., 2007).

TABELA 1: Comportamento de 37 estirpes de rizóbios e oito estirpes padrões aos estresses abióticos e bióticos.

	pH do meio		temperatura				Número de antibióticos
	pH 4	pH 10	39°C	41°C	43°C	45°C	
L-31	+	+	+	-	-	-	13
L-32	+	+	+	+	+	+	7
L-33	+	+	+	+	+	+	9
L-34	+	+	+	+	+	+	11
L-35	+	+	+	+	+	+	12
L-36	+	+	+	+	+	+	8
L-37	-	+	+	+	+	+	12
L-38	+	+	+	+	+	+	12
L-39	-	+	+	+	+	+	6
L-40	+	+	+	+	+	+	7
L-41	+	+	+	+	+	+	12
L-42	+	+	+	+	+	+	14
L-43	+	+	+	+	+	+	13
L-44	-	+	+	+	-	-	14
L-45	-	+	+	+	+	-	6
L-46	-	+	+	+	+	+	10
L-47	-	+	+	+	+	+	14
L-48	+	+	+	+	+	+	14
L-49	+	+	+	+	+	+	5
L-50	-	+	+	-	-	-	11
L-51	-	+	+	+	+	+	13
L-52	+	+	+	+	+	+	7
L-53	+	+	+	+	+	+	12
L-54	+	-	+	+	+	+	8
L-55	+	+	+	-	-	-	1
L-56	-	+	+	+	+	+	14
L-57	+	+	+	+	+	+	12
L-58	-	+	+	+	+	-	14
L-59	-	+	+	+	+	+	13
L-60	+	+	+	+	+	+	13
L-61	-	+	+	+	+	+	10
L-62	+	+	+	+	+	+	6
L-63	-	-	+	+	+	+	8
L-64	-	+	+	+	+	+	10
L-65	+	+	+	+	+	+	5
L-66	+	+	+	+	+	+	8
L-67	+	+	+	+	+	-	9
BR 2801	+	+	-	-	-	-	13
BR 3301	+	+	+	-	-	-	11
BR 3302	-	+	+	+	+	+	15
BR 3267	-	+	+	+	+	+	8
BR 3486	+	+	+	+	+	-	2
BR 3471	+	+	+	+	+	-	10
BR 2003	+	+	-	-	-	-	10
BR 3262	+	+	-	-	-	-	14
TOTAL	29	43	42	38	37	32	

Legenda: (+) crescimento da estirpe, (-) ausência de crescimento. A última coluna contém a quantidade de antibióticos que a estirpe foi resistente.

CONCLUSÃO

Em geral, as estirpes de rizóbios mostraram resistência aos estresses bióticos e abióticos avaliados, com destaque para as estirpes denominadas LAMAB 42 e LAMAB 48. Estudos posteriores são necessários para identificação genética dessas estirpes e para avaliação *in vivo* da eficiência das mesmas.

REFERÊNCIAS

- BARAÚNA, A. C.; SILVA, K.; PEREIRA, G. M. D.; KAMINSKI, P. E.; PERIN L.; ZILLI, J. E. Diversity and nitrogen fixation efficiency of rhizobia isolated from nodules of *Centrolobium paraense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.4, p.296-305, 2014.
- BERINGER, J. E. A factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p.188-198, 1974.
- BOUKHATEM, Z. F.; DOMERGUE, O.; BEKKI, A.; MERABET, C.; LAJUDIE, P.; GALIANA, A. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p.534-547, 2012.
- CEVHERI, C.; KÜÇÜK, Ç.; ÇETIN, E. Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.13, p. 2423-2429, 2011.
- COSTA, F. M.; SCHIAVO, J.A.; BRASIL, M.S.; LEITE, J.; XAVIER, G. R.; FERNANDES JR., P. I. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n.1, p.469-482, 2014.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP]. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p.1604-1612, 2012.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; REIS, V.M. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 33p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252). 2008.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842. 2003.
- FERREIRA, P. A. A.; BOMFETI, C A.; SOARES, B. L.; MOREIRA, F. M. S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p.1947-1959, 2012.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n.18, p. 6726-6733, 2012.

GUNDALE, M. J.; NILSSON, M.; BANSAL, S.; JÄNDERLUND, A. The interactive effects of temperature and light on biological nitrogen fixation in boreal forests. **New Phytologist**, v.194, p.453-463, 2012.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, S. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.7, p.667-672, 2005.

HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of N_2 fixation and NO_3^-/NH_4^+ assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.98, p.32-39, 2014.

INDRASUMUNAR, A.; DART, P. J.; MENZIES, P. W. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil stress factors in acidic agar media. **Soil Biology & Biochemistry**, v.43, p.2046-2052, 2011.

INDRASUMUNAR, A.; MENZIES, N. W.; DART, P. J. Calcium affects the competitiveness of acid-sensitive and acid-tolerant strains of *Bradyrhizobium japonicum* in nodulating and fixing nitrogen with two soybean cultivars in acid soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.46, p.115-122, 2012.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JR., P.I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.5, p.395-402, 2014.

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 Ciências do Solo**, v. 30, p. 235-246, 2006.

MOHAMMADI, K.; SOHRABI, Y.; HEIDARI, G.; KHALESRO, S.; MAJIDI, M. Effective factors on biological nitrogen fixation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 12, p. 1782-1788, 2012.

PEREIRA DE LYRA, M. C. C.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. A.; SANTOS, C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n.17, p. 2147-2156, 2013.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.1, p. 99-108, 1999.

PINHEIRO, M.S.; SOUSA, J.B.; BERTINI, C.H.C.M.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C.M. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbio nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p.2071-2082, 2014.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.42, p.489-512, 2011.

RUIZ-DÍEZ, B.; FAJARDO, S.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p.66-78, 2012.

SANTOS, C. E. R. E. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V. FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SINGH, S. K.; JAISWAL, S. K.; VAISHAMPAYAN, A.; DHAR, B. Physiological behavior and antibiotic response of soybean (*Glycine max* L.) nodulating rhizobia isolated from Indian soils. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.19, p. 2093-2102, 2013.

SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing Bacteria. **Scientia Agricola**, v.71, n.3, p.171-180, 2014.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 164 p. 1970.

VITOUSEK, P. M.; MENGE, D.N.L.; REED, S.C.; CLEVELAND, C.C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 368: 20130119.<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0119>. 2013.

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 Fertility Soils**, v.27, p.386-392, 1998.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, v.20, n. 4, p. 01-09, 2007.

ZILLI, J. É.; SILVA NETO, M. L.; FRANÇA JR., I.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.739-742, 2011.