

DIVERSIDADE FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO DO SEMIÁRIDO

Rebeca Mendes Feitoza¹, Leandro Lopes Silva², Marcelo de Sousa Pinheiro³,
Suzana Cláudia Silveira Martins⁴, Claudia Miranda Martins⁴

¹Graduanda de Agronomia da Universidade Federal do Ceará

²Mestrando em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

³Doutorando em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará

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

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

RESUMO

Rhizobium são um grupo de bactérias que formam nódulos nas raízes das leguminosas, convertendo o nitrogênio atmosférico em compostos de amônia e nitrogênio fornecido à planta hospedeira. Estas bactérias apresentam uma grande diversidade taxonômica e fenotípica. A caracterização de bactérias envolve a descrição de muitas propriedades relacionadas à morfologia, bioquímica, metabolismo, ácidos nucleicos e ecologia, que são pré-requisitos para a identificação e base sistemática desse grupo de organismos. O objetivo deste estudo foi caracterizar sob o aspecto fisiológico e bioquímico estirpes de rizóbio oriundas da Unidade de Conservação "Parque Nacional de Ubajara". Vinte e oito (28) estirpes da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará foram selecionadas e avaliadas quanto à tolerância a pH extremos, atividade da amilase, atividade celulolítica e capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono. Das 28 estirpes, 21 apresentaram tolerância a ambos os valores de pH testados, nenhuma apresentou atividade amilolítica, no entanto apenas uma cepa, L-90, apresentou atividade celulolítica extracelular, atingindo um índice enzimático de 2,41. A estirpe L-96 apresentou o maior índice de solubilização de fosfato. As cepas L-83 e L-98 foram as únicas a não utilizar todas as fontes de carbono avaliadas.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias Diazotróficas, Caracterização Fenotípica, Fixação biológica de nitrogênio.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMISTRY DIVERSITY OF RHIZOBIUM STRAINS FROM THE SEMIARID

ABSTRACT

Rhizobium is a group of bacteria that form nodules on legume roots, which converts atmospheric nitrogen into ammonia and nitrogen compounds provided to the host plant. These bacteria exhibit a great taxonomic and phenotypical diversity. The characterization of bacteria involves the description of many properties on the

morphology, biochemistry, metabolism, nucleic acids and ecology, which are prerequisites for the identification and systematic basis of this group of organisms. The aim of this study was to characterize the physiologically and biochemical aspect under rhizobia Conservation Unit "Ubajara National Park" in the state of Ceará. Twenty eight (28) strains of the Culture Collection of Diazotrophic Bacteria from the Environmental Microbiology Laboratory (LAMAB) in the Biology Department of the Federal University of Ceará were selected and evaluated as to extreme pH tolerance, amylase activity, cellulolytic activity and ability to use different carbon sources. Of the 28 strains, 21 showed tolerance to both pH values tested, none showed extracellular amylolytic activity, however only one strain, L-90, presented extracellular cellulolytic activity, reaching an enzymatic index of 2.41. The L-96 strain showed the highest phosphate solubilization index. The L-83 and L-98 strains were the only ones not to use all the carbon sources evaluated.

KEYWORDS: Diazotrophic Bacteria, Phenotypic characterization, Biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

Rhizobium spp. são um grupo de bactérias que atuam como fixadoras simbióticas de nitrogênio. Estas bactérias infectam as raízes das leguminosas, levando à formação de nódulos onde a fixação ocorre (SINGH et al., 2008). A simbiose entre leguminosas e rizóbio possui um importante papel na agricultura sustentável e é amplamente aceita como alternativa a fertilização química (FREITAS et al., 2007). Para a produção desse tipo de fertilizante são necessárias altas temperaturas e pressões, em um processo industrial, essas condições são exigidas para quebrar a forte ligação da molécula de N₂, em contraste as condições amenas presentes na fixação biológica de nitrogênio promovida pelos micro-organismos (NUNES et al., 2003).

A população de rizóbio no solo pode ser extremamente variada, tanto na composição como nas características simbióticas (LEITE et al., 2009). Essas bactérias possuem uma grande diversidade taxonômica e fenotípica e alguns grupos são distribuídos mundialmente (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012).

Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (FREITAS et al., 2007). A avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos de micro-organismos. Características culturais podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre micro-organismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (JESUS et al., 2005).

Os métodos fenotípicos clássicos são usados nos protocolos de identificação, por compreenderem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do maior número possível de isolados e pela adaptabilidade ecológica às condições ambientais. Estudos sobre a tolerância em condições de salinidade, pH, temperatura e antibióticos são métodos fenotípicos frequentemente utilizados para estabelecer correlações entre os dados de diversidade metabólica e eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio (FREITAS et al., 2007). Além disso, estudos bioquímicos e fisiológicos são básicos para detalhar a taxonomia polifásica das estirpes (MAATALLAH et al., 2002).

Poucas são as informações referentes ao perfil enzimático de bactérias

rizobiais (OLIVEIRA et al., 2010), dessa forma tendo em vista a extensão do semiárido brasileiro, e os poucos estudos sobre a comunidade microbiana desse ecossistema, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a diversidade fisiológica e bioquímica de bactérias diazotróficas oriundas da Unidade Conservação “Parque Nacional de Ubajara” no Estado do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das estirpes

Foram utilizadas 28 estirpes autenticadas como rizóbio (SILVA et al., 2014) e recuperadas da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará. As estirpes são provenientes de amostras de solo do Parque Nacional de Ubajara, localizado no Planalto da Ibiapaba, ao noroeste do Estado do Ceará a 320 km de Fortaleza, limitando-se com o Estado do Piauí. A área do parque está compreendida entre a latitude 3°46' S e longitude 40°54' W com altitudes que variam de 800 a 1.100 m (CUNHA & ARAÚJO, 2014). Como comparação, as estirpes padrão BR 3471 (*Cupriavidus taiwanensis*), BR 3486 (*Burkholderia phymatum*), INPA 03-11B-*Bradyrhizobium* sp (BR 3301), UFLA 03-84-*Bradyrhizobium* sp (BR 3302), BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp), BR 3262- (*Bradyrhizobium* sp), BR 2003 e BR 2801- (*Bradyrhizobium elkanii*) foram submetidas aos mesmos testes das estirpes obtidas.

Tolerância a pH extremos

O teste de tolerância das estirpes para valores extremos de pH foi realizado em meio líquido YM (extrato de levedura-manitol) (VINCENT, 1970) modificado para pH 4, com adição de ácido clorídrico (1 M) e pH 10, com adição de hidróxido de sódio (1 M), medidos em pHmetro. Cada estirpe foi inoculada em tubos de ensaio com o meio de cultura ajustado para os referidos valores de pH. Tubos contendo apenas o meio de cultura foram usados como controle negativo.

As estirpes foram mantidas em agitação orbital por sete dias, a 125 rotações por minuto. Tubos que apresentaram turbidez no caldo, em comparação ao controle negativo, foram considerados positivos e os que não apresentaram turbidez foram considerados negativos. Os testes foram realizados em triplicata.

Atividade amilolítica

As estirpes foram cultivadas em meio líquido YM sob agitação constante de 125 rotações por minuto em agitador orbital até que fosse observado o crescimento das estirpes, em seguida foram aliquotados 10µL em três pontos equidistantes de placas de Petri contendo meio de cultura YMA (extrato de levedura-manitol-ágar) modificado pela substituição do manitol por amido como única fonte de carbono e sem a adição do indicador de pH azul de bromotimol (OLIVEIRA et al., 2007).

As culturas foram incubadas em câmara de crescimento (B.O.D.) a 28±2°C por sete dias. Após esse período, foi adicionada tintura de iodo em toda a placa e observou-se a formação ou não de um halo claro ao redor das colônias, indicando atividade amilolítica, ou não.

Os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise produzidos foram medidos utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices enzimáticos (IE) através da razão halo (mm)/colônia (mm).

Atividade celulolítica

As estirpes foram cultivadas em meio líquido YM sob agitação constante de 125 rotações por minuto em agitador orbital até que fosse observado o crescimento das culturas, em seguida foram aliqüotados 10µL em três pontos equidistantes de placas de Petri contendo meio de cultura YMA modificado pela substituição do manitol por carboximetilcelulose como única fonte de carbono e sem o uso de indicador de pH (OLIVEIRA et al., 2006).

A produção de celulase foi detectada, após sete dias de incubação em câmara de crescimento (B.O.D.) a 28±2°C. Após desse período, foi adicionado 10 mL de solução corante vermelho congo (1g.L⁻¹) sobre as placas, após 15 minutos de repouso a solução foi descartada. Em seguida as culturas foram lavadas com solução de NaCl 2M e deixadas em repouso com esta solução por mais 15 minutos.

A presença de zonas claras ao redor das culturas foi indicadora da atividade da celulase. Os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise produzidos foram medidos para o cálculo dos índices enzimáticos (IE).

Solubilização de fosfato

Para verificar a solubilização de fosfato de cálcio foi utilizado meio de cultura específico para bactérias solubilizadoras, meio GL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), que continha 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 18 g de ágar. A este meio foram adicionadas uma solução contendo 0,25 g. L⁻¹ de K₂HPO₄ e outra solução contendo 1g. L⁻¹ de CaCl₂, ajustando-se o pH para 6,5, com o intuito de se formar fosfato de cálcio precipitado (HARA & OLIVEIRA, 2004). As estirpes de rizóbio, crescidas em meio YM (pH 6,5) foram aliqüotadas em três pontos equidistantes da placa de Petri com o meio de solubilização.

O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia, e o diâmetro da colônia foram medidos 18 dias depois da inoculação utilizando-se um paquímetro digital para o cálculo do IE. Os valores obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de comparação de médias Skott-Knott a 5% de probabilidade usando o programa Sisvar (FERREIRA, D.F. Sisvar version 5.0 DEX/UFLA, 2003).

Fontes de carbono

Foi avaliada a capacidade de utilização dos seguintes carboidratos: sacarose, glucose, arabinose, ramnose, frutose e xilose. O meio de cultura YMA foi modificado com a adição de cada um dos carboidratos, na concentração de 1%, em substituição ao manitol. As soluções contendo os carboidratos na concentração de 1g. L⁻¹ foram esterilizadas por filtração com uma membrana filtrante de 0,22µm e adicionadas ao meio esterilizado (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012).

As bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo o meio modificado e incubadas a 28° C por sete dias. Para esse ensaio foram realizadas três repetições por estirpe. A avaliação da capacidade de utilização dos carboidratos foi realizada observando a presença ou ausência de crescimento das estirpes no meio modificado.

Agrupamento de dados

Os resultados obtidos em todas as análises foram convertidos em uma matriz binária de dados, que foram identificados da seguinte forma: “0” é uma característica ausente e “1” é uma característica presente. Utilizando o aplicativo computacional

PAST (HAMMER et al., 2001) foi possível construir uma matriz de similaridade que foi usada para elaboração de um dendrograma, permitindo o agrupamento de isolados semelhantes. Adotou-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), para o cálculo da matriz de similaridade, e o coeficiente de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tolerância a pH extremos

As estirpes foram capazes de crescer nos dois valores de pH testados, das 28 estirpes, 25 apresentaram tolerância ao meio ácido (pH 4), 24 apresentaram tolerância ao meio básico (pH 10) e 21 apresentaram tolerância a ambos os valores de pH avaliados. Respostas similares foram obtidas KENENI et al. (2010) que testaram cinco estirpes nativas de rizóbios oriundos de feijão-fava do norte da Etiópia região de solos predominantemente ácidos e todas resistiram ao pH 4. Em relação as estirpes padrão, no pH alcalino, todas foram capazes de crescer, enquanto 75% cresceram no meio de pH 4.

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, afetando a multiplicação e a sobrevivência dos rizóbios e a formação de nódulos (RUFINI et al., 2011). ELBOUTAHIRI et al. (2010) avaliando isolados de rizóbios observaram que apenas 3,18% do isolados cresceram em pH 3,5 e FENTAHUN et al. (2013) observaram crescimento de 42% dos isolados em pH 4. Diminuição na abundância e diversidade de *Rhizobium* spp foram relatadas por ANDRADE et al. (2002) com o aumento da acidez do solo. No entanto, O'HARA et al. (2002) constataram que a abundância e diversidade de *Rhizobium* spp. fornece um grande recurso de germoplasma natural com alta adaptabilidade em diferentes condições do solo, como foi observado nesse estudo.

Os resultados obtidos por PINHEIRO et al. (2014) com estirpes obtidas do semiárido revelaram a capacidade de 71% crescerem em pH 10, ao passo que 32% das estirpes cresceram em pH 4, indicando a influência do pH baixo sobre a bactéria. Destaca-se os resultados provenientes de região semiárida obtidos por SOUSA et al. (2014), no qual 67% das cepas oriundas de feijão-caupi foram resistentes ao pH 4 enquanto que 96% foram resistentes ao pH 10.

Diversos autores relatam crescimento de rizóbios na faixa de 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 uma melhor nodulação e desempenho simbiótico (INDRASUMUNAR et al., 2011).

Atividade amilolítica

Dentre as estirpes avaliadas nenhuma apresentou atividade amilolítica expressiva, não sendo capazes de produzir enzimas extracelulares, hidrolisando apenas o amido presente sob a colônia. Outros trabalhos mostram o potencial de rizóbios na produção de amilase, como o de FERNANDES JÚNIOR et al. (2012) que estudando 27 isolados de rizóbios verificaram que 4 se destacaram, dos quais um, 47.3b, apresentou IE maior que 3,5 e o de OLIVEIRA et al. (2007) onde sete (36,8%) dos isolados exibiram IE $\geq 2,1$, sendo considerados pelos autores bons produtores de amilase.

Em estudo para avaliar a influência do pH e temperatura sobre a atividade

amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia, OLIVEIRA et al. (2010) observaram que os isolados INPA R-110 e R-822 foram os melhores produtores de amilases, com atividades enzimáticas maiores do que 2,0.

O amido é um dos principais compostos de reserva em plantas, por esta razão, vários organismos adquiriram a capacidade de produzir amilases, enzimas que degradam o amido com subsequente liberação de glucose e uso no metabolismo energético (AMARAL et al., 2007).

Atividade celulolítica

Apenas uma estirpe, a L-90, apresentou atividade celulolítica extracelular (Tabela 1), atingindo um IE de 2,41. De acordo com OLIVEIRA et al. (2006) o índice enzimático (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos micro-organismos em meio sólido. A avaliação dos organismos produtores de enzimas correlaciona diretamente o diâmetro do halo de degradação com a habilidade degradativa sendo recomendado um IE ≥ 2 para considerar um micro-organismo produtor de enzimas.

Da coleção de rizóbios de leguminosas forrageiras do Laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS) da Universidade do Estado da Bahia, NUNES et al. (2013) estudaram dez isolados e encontraram quatro que apresentaram capacidade de produzir carboximetilcelulase extracelularmente, destacando um isolado que apresentou um IE de 2,70.

Avaliando a atividade de 67 isolados de rizóbios, oriundos de amostras de solo do Estado do Amazonas, para produção de carboximetilcelulase, OLIVEIRA et al. (2006), observaram esse comportamento em seis dos isolados testados com IE variando entre 1,5 e 2,0.

TABELA 1: Diâmetros medidos e índice enzimático da estirpe L-90.

Estirpe	Repetição	Halo (mm)	Colônia (mm)	IE
L – 90	1	18,92	6,88	
	2	16,47	7,43	
	3	17,49	7,67	
Média		17,63	7,33	2,41

Segundo ROBLEDO et al. (2008) o principal evento no desenvolvimento da simbiose rizóbio-leguminosa é a degradação da parede celular da planta para a passagem da bactéria, a participação de enzimas capazes de degradar celulose são previstas pelo menos duas vezes durante o processo de infecção. Ainda, segundo os autores bactérias capazes de nodular leguminosas para a fixação de nitrogênio apresentam atividade celulolítica em algum nível.

Solubilização de fosfato

No total, quatro estirpes (14,3%) e uma estirpe padrão solubilizaram fosfato extracelularmente. Apenas a estirpe L-96 apresentou índice enzimático acima de 2, o menor índice foi o da estirpe BR 3486 (IE= 1,1).

HARA & OLIVEIRA (2004) verificaram que 39% dos isolados de rizóbios estudados foram efetivos na solubilização do fosfato, mas em diferentes níveis de eficiência. CHAGAS JÚNIOR et al. (2010) encontraram resultados semelhantes, ao verificaram a capacidade de solubilizar fosfato em 33,2% dos 208 isolados de rizóbio avaliados, ressaltando que 95,6% diminuíram o pH do meio, evidenciando a

importância da formação de ácidos orgânicos como mecanismo de solubilização. Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de ânion de PO_4^{-2} por ânion ácido (SILVA et al., 2011).

PIEX et al. (2001) observaram aumento na produtividade de ervilha e cevada, quando inoculados com rizóbios solubilizadores de fosfato de cálcio. Dessa forma, ressalta-se o potencial da estirpe L-96 no incremento da concentração de fósforo solúvel na rizosfera e disponibilizá-lo para as plantas.

Fontes de carbono

Quanto à capacidade em utilizar diferentes fontes de carbono, somente duas estirpes, L-83 e L-98, não utilizaram todas as fontes avaliadas (Tabela 2). Todas as estirpes padrão foram capazes de utilizar as seis fontes de carbono. Esses resultados corroboram com os obtidos por PATEL & DUBEY (2014) e SAMPAIO (2013), que demonstraram a capacidade dos rizóbios de utilizar várias fontes diferentes de carbono, incluindo as utilizadas nesse estudo.

FERNANDES JÚNIOR et al. (2012) observaram que 92, 89, e 89% dos isolados de rizóbio apresentaram crescimento positivo usando frutose, glucose e xilose, respectivamente, como única fonte de carbono. Segundo os autores a habilidade em metabolizar uma grande variedade de fontes de carbono associadas a outras características fisiológicas, como tolerância a salinidade e antibióticos indicam grande capacidade saprofítica por parte dos rizóbios.

A disponibilidade de fontes de carbono pode repentinamente tornar-se limitada e o uso de uma ampla variedade dessas fontes parece ser essencial à competitividade e sobrevivência dos rizóbios (JENSEN et al., 2002). EL IDRISSI & ABDELMOUMEN (2008) estudando a capacidade de rizóbios em utilizar diferentes fontes de carbono sob condições de estresse salino verificaram que o manitol não era a fonte de carbono preferida pelos isolados, uma vez que não foi capaz de sustentar o crescimento bacteriano nestas condições, enquanto galactose, celobiose, sacarose e frutose foram utilizadas no meio salino.

Diversidade de rizóbios

Com os resultados obtidos a partir dos testes de tolerância a pH extremo, atividade amilolítica, atividade celulolítica, capacidade de solubilizar fosfato e utilização de diferentes fontes de carbono, foi possível construir um dendrograma de similaridade (FIGURA 1), considerando um nível de 96% de similaridade, que diferenciou 8 grupos.

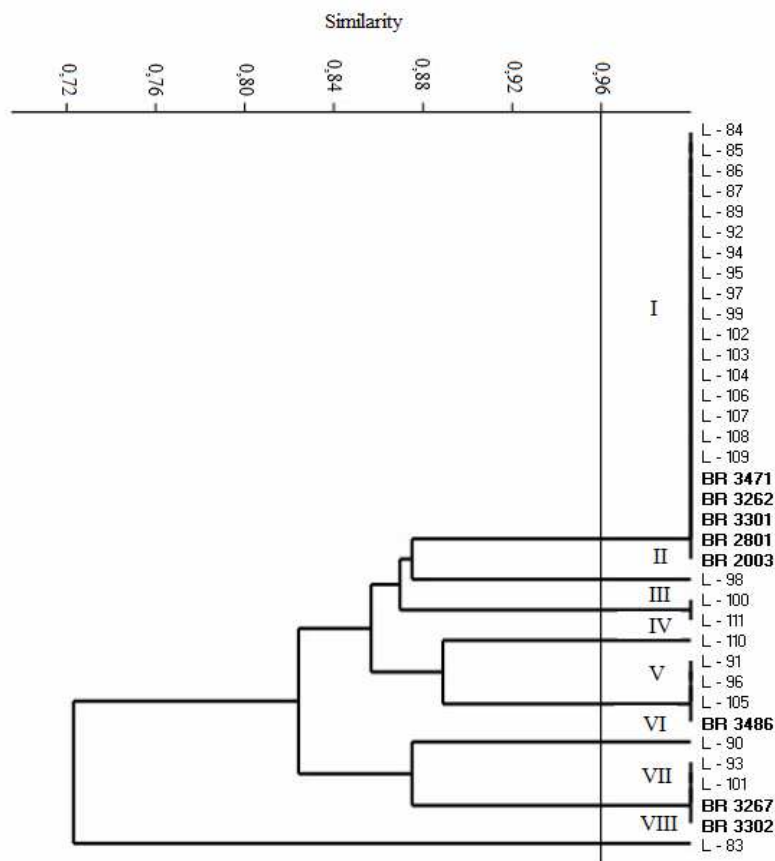


FIGURA 1: Dendrograma construído com os dados obtidos dos testes para caracterização fisiológica e bioquímica de 28 estirpes de rizóbio oriundas de nódulos radiculares de feijão-caupi e oito estirpes padrões BR 3471, BR 3486, BR 3301, BR 3302, BR 3267, BR 3262, BR 2003 e BR 2801, método de agrupamento UPGMA usando o coeficiente de Jaccard. A linha vertical indica grupos formados com 96% de similaridade.

O grupo I foi o maior formado, constituído de 22 estirpes que foram capazes de tolerar pH extremo, tanto ácido como básico e utilizar todas as fontes de carbono avaliadas. O segundo grupo é formado apenas pela estirpe L-98 que apesar de tolerar pH extremo foi a única a não utilizar a ramnose como fonte de carbono. O grupo III é formado pelas estirpes que utilizaram todas as fontes de carbono, mas não cresceram em pH 10, tolerando somente o meio ácido. O grupo IV apresenta a estirpe que é capaz de solubilizar fosfato e utilizar todas as fontes de carbono, mas não de tolerar pH alcalino.

O grupo V é formado pelas estirpes capazes de solubilizar fosfato incluindo a estirpe padrão BR 3486, que também utilizam todas as fontes de carbono e toleram pH extremo. O sexto grupo é formado pela estirpe L-90 a única que apresentou atividade celulolítica extracelular sendo capaz de utilizar todas as fontes de carbono, mas não de tolerar pH ácido.

O grupo VII é formado pelas estirpes capazes de utilizar todas as fontes de carbono, mas que não toleraram pH ácido nem apresentaram nenhuma das outras

atividades enzimáticas avaliadas. O oitavo e último grupo, formado pela estirpe L-83, cresceu em meio ácido, mas não em meio alcalino e não foi capaz de utilizar uma das fontes de carbono, a glucose.

Apesar de não apresentarem atividades enzimáticas expressivas, 92,85% das estirpes foram capazes de utilizar todas as fontes de carbono e 75% toleraram níveis extremos de pH, características importantes na sobrevivência das bactérias em condições adversas, além de apresentarem potencial para solubilização de fosfato.

CONCLUSÃO

Em geral, as estirpes de rizóbio mostraram significativa diversidade de perfis metabólicos, destacando-se a estirpe L-96 que apresentou o maior índice de solubilização de fosfato e a estirpe L-90 por ser capaz de utilizar todas as fontes de carbono, além de apresentar atividade celulolítica extracelular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento pelos recursos obtidos através do Edital Chamada CNPq/ICMBio - Nº 13/2011 - Seleção Pública de Propostas para a pesquisa sobre o manejo, uso e conservação da biodiversidade e a proteção do patrimônio cultural e dos recursos naturais em unidades de conservação federais e seu entorno no bioma Caatinga.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L. I. V. do; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E.; The diversity of *Phaseolus-nodulating* rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4025-4034, 2002.

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.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CUNHA, B. B.; ARAÚJO, R. C. P. Avaliação das Pressões e Ameaças Ambientais sobre o Parque Nacional de Ubajara-Ceará: Uma perspectiva da Efetividade de Gestão. **REDE - Revista Eletrônica do Prodepa**, v.8, n.1, p. 46-66, 2014.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, 2010.

EL IDRISSE, M. M.; ABDELMOUMEN, H. Carbohydrates as carbon sources in rhizobia under salt stress. **Symbiosis**, v. 46, n. 01, p. 33-44, 2008.

FENTAHUN, M.; AKHTAR, M. S.; MULETA, D.; LEMESSA, F.; Isolation and characterization of nitrogen deficit *Rhizobium* isolates and their effect on growth of haricot bean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 46, p. 5942-5952, 2013.

FERREIRA, D.F. SISVAR software: versão 5.0. Lavras: DEX/UFLA, 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.

FERNANDES JUNIOR, P. I.; LIMA, A. A. de; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J. de; 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.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. E S.; STAMFORD, N. P.; DE LYRA, M. DO C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**. v. 4, n.1, p. 9, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm> Acesso em: 17 nov. 2014.

HARA, S. A. F.; OLIVEIRA, S. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álcalis de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n.2, p. 343-357, 2004.

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.

JENSEN, J. B.; PETERS, N. K.; BHUVANESWARIL, T. V. Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 11, n. 184, p. 2978–2986, 2002.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. de S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. de. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

KENENI, A.; ASSEFA, F.; PRABU, P.C. Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, p.365-376, 2010.

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 Ciências do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.

MAÂTALLAH, J.; BERRAHO, E.B.; SANJUAN, J.; LLUCH, C. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. **Agronomie**, v. 22, p. 321-329, 2002.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de Nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

NUNES, G. F. de O.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, A. A.; SANTOS, A. B. dos; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V. Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 34., 2013. Florianópolis. **Anais...** Viçosa : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/967759>>. Acesso em: 10 out. 2014.

O'HARA, G. W.; HOWIESON, J.G.; GRAHAM, P.H. Nitrogen fixation and agricultural practice. In: Leigh, G. J., ed. Nitrogen fixation at the millennium. **Elsevier**, p. 391-420, 2002.

OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 40, n.2, p.401-404, 2010.

PATEL, J.; DUBEY, S. K. Effect of different carbon source on growth of *Rhizobium* belonging to different region of Chhattisgarh, India. **International Journal of Current**

Microbiology and Applied Sciences, v. 3, n. 10, p. 830-836, 2014.

PIEX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; ÂNEZ-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, n. 1, p. 103-110, 2001.

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

ROBLEDO, M.; JIMÉNEZ-ZURDO, J. I.; VELÁZQUEZ, E.; TRUJILLO, M. E.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; RAMOS, B.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; DAZZO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. *Rhizobium* cellulase CelC₂ is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 19, n. 105, p. 7064-7069, 2008.

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.

RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B. de; MOREIRA, F. M. de S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, n.1, p.81-88, 2011.

SAMPAIO, F. B. **Isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 86 f. 2013.

SILVA, A. C. S; CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2, n. 1, p. 37- 42, 2011.

SILVA, L. L.; PINHEIRO, M. de S.; SOUSA, J. B. de; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Diversidade de rizóbio da unidade de conservação Parque Nacional de Ubajara no Estado do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**. v.10, n.19, p. 2141-2156, 2014.

SINGH, B.; RAVNEET, K.; KASHMIR, S. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 20, p. 3671–3676, 2008.

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 Agrícola**, v. 71, n.3, p. 171-180, 2014.

SOUSA, J.B.; PINHEIRO, M.S.; SILVA, L.L.; MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M. Caracterização de bactérias nativas de solo do semiárido isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n. 19, p. 2797-2806, 2014.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n.1, p. 12-22, 1982.

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