

INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE CULTIVO E DA TURFA NO COMPORTAMENTO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*⁽¹⁾

D. L. MIGUEL⁽²⁾ & F. M. S. MOREIRA⁽³⁾

RESUMO

A acidez dos solos representa um problema que afeta grandes áreas agrícolas pelo mundo, principalmente nos trópicos, onde fósforo e nitrogênio também são limitantes. No caso do nitrogênio, a fixação biológica torna-se uma das alternativas mais viáveis do ponto de vista ecológico e econômico, por diminuir o uso e o impacto causado pelos fertilizantes nitrogenados. Neste trabalho, foram realizados dois experimentos *in vitro* e um em casa de vegetação com quatro estirpes de *Bradyrhizobium* (Br 4406, Br 29, SEMIA 587 e INPA 03-11B), no Departamento de Ciência do Solo (UFLA), de julho de 1998 a julho de 1999, para verificar o efeito de três valores de pH (5,0; 6,0; 6,9) no crescimento destas em meio de cultura YM, na sua simbiose com soja, assim como na sua sobrevivência em inoculantes produzidos com turfa. No primeiro experimento, as estirpes de *Bradyrhizobium* tiveram um comportamento diferenciado em meio líquido, obtendo melhor desempenho em pH 6,0, tanto em número de unidades formadoras de colônias quanto em produção de exopolissacarídeos. No segundo experimento, o número de nódulos, a atividade da nitrogenase (Nase), as massas secas de nódulos, raízes e parte aérea de plantas de soja, de modo geral, não foram influenciados pelos valores de pH de cultivo das estirpes no inoculante. Entretanto, a estirpe INPA 03-11B mostrou-se efetiva, apresentando número de nódulos e atividade de Nase semelhantes aos de Br 29 e SEMIA 587, que são recomendadas como estirpes inoculantes, devendo, assim, ser indicada para testes de eficiência em campo. No terceiro experimento, com exceção da Br 29, que atingiu maior sobrevivência de células em pH 6,0, as outras estirpes tiveram sobrevivência semelhante neste valor de pH e em pH 6,9. O melhor desempenho das estirpes de *Bradyrhizobium* em pH 6,0 no meio de cultura e em turfa demonstrou a possibilidade do uso de inoculantes corrigidos para esse valor de pH, como modo de pré-adaptação às condições de acidez dos solos tropicais.

Termos de indexação: fixação biológica do N₂, soja, inoculante turfoso, tolerância à acidez, produção de exopolissacarídeos.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA. Recebido para publicação em setembro de 2000 e aprovado em junho de 2001.

⁽²⁾ Pós-Graduando do Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista da CAPES. E-mail: divino@cenargen.embrapa.br

⁽³⁾ Professora Adjunta, Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br

SUMMARY: *INFLUENCE OF MEDIUM AND PEAT PH ON THE BEHAVIOUR OF BRADYRHIZOBIUM STRAINS*

Soil acidity is one of the greatest problems faced in the management of agricultural lands around the world, mainly in the tropics, where phosphorus and nitrogen are also limiting factors. In the case of nitrogen, biological nitrogen fixation is the most economical and ecological alternative to decrease the use and impact caused by nitrogen fertilizers. Two "in vitro" experiments and one under greenhouse conditions using four Bradyrhizobium strains (BR 4406, BR 29, SEMIA 587 and INPA 03-11B) were carried out at the Soil Science Department, at Federal University of Lavras from July 1998 to July 1999, aiming to verify the effect of three pH values (5.0; 6.0 and 6.9) on growth of Bradyrhizobium strains in YM medium, soybean symbiosis and peat survival. In the first experiment, Bradyrhizobium strains had differentiated behaviour at the three pHs of YM medium, and had the highest colony forming unities and exopolysaccharide production at pH 6.0. In the second experiment, nodule number (NN), nitrogenase (Nase) activity, dry matter of nodules (NDM), roots (RDM) and shoots (SDM) of soybean were not affected by the different pHs of the culture medium used to produce peat inoculants. INPA 03-11B had similar efficiency to BR 29 and SEMIA 587, recommended as inoculant strains for soybean, on the production of NN, Nase activity, NDM, RDM and SDM. In the third experiment, all strains had the same cell survival at pH 6 and 6.9, except BR 29, which had the highest survival at pH 6.0. The best behaviour of Bradyrhizobium strains at pH 6.0 in culture medium and in peat survival indicated the possibility to use this pH in the peat inoculant production as a means of acid adaptation to this soil stress condition in the tropics.

Index terms: Biological nitrogen fixation, soybean, peat based inoculant, acid tolerance, exopolysaccharide production.

INTRODUÇÃO

A acidez dos solos representa um problema que afeta grandes áreas agrícolas pelo mundo, principalmente nos trópicos, onde os teores de fósforo e nitrogênio são limitantes. No caso do nitrogênio, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada pela simbiose de rizóbio com leguminosas, como a soja, pode suprir as necessidades de nitrogênio dessa cultura, quando a nodulação por estirpes eficientes é estabelecida. Portanto, a inoculação de estirpes selecionadas e de comprovada eficiência é uma das alternativas mais viáveis, ecológica e economicamente, podendo alcançar produções equivalentes às obtidas com fertilizantes nitrogenados, além de diminuir o uso e o impacto causado por eles (Dobereiner & Duque, 1980).

A acidez dada pela concentração do íon H⁺ (acidez ativa) e expressa na escala de pH está, normalmente, associada a outros fatores, como: saturação e toxidez por alumínio e manganês, baixa CTC e disponibilidade de nutrientes. Condições de acidez no solo atuam negativamente nas atividades da microbiota do solo, principalmente dos microrganismos benéficos ao desenvolvimento e, ou, produção das plantas como os rizóbios, limitando sua multiplicação e sobrevivência, conseqüentemente reduzindo a nodulação e fixação de nitrogênio (Graham et al., 1982; Hartel & Alexander, 1983; Graham, 1991).

Quando microrganismos crescem em condições levemente ácidas (pH 5,6 a 5,8), sendo posteriormente expostos a valores baixos de pH (3,5 a 4,0), sua sobrevivência à nova condição é significativamente maior do que se fossem previamente crescidos em condições ótimas (pH 7,0). Esse fenômeno é denominado de "acid habituation" (Goodson & Rowbury, 1989a,b) ou adaptative tolerance response (ATR) (O'Hara et al., 1989; Dilworth et al., 1999). Assim como em bactérias entéricas (Foster & Hall, 1991; Fabber & Pagatto, 1992), em rizóbio ATR envolve a síntese de várias proteínas resultantes do choque provocado pela acidez (O'Hara & Glenn, 1994), as quais auxiliam a membrana externa na recuperação dos fosfolipídeos, evitando os efeitos danosos da acidez (Correa & Barnex, 1997). Diferenças na capacidade de crescimento em meios de cultura modificados com o intuito de simular os estresses associados à maior concentração do íon H⁺ sobre a tolerância à acidez de estirpes de rizóbio são citadas em vários trabalhos (Cunningham & Munns, 1984a,b; Richardson & Simpson, 1989; O'Hara & Glenn, 1994; Reeve et al., 1997; Dilworth et al., 1999).

A seleção de estirpes com melhor crescimento em meio de cultura com valores de pH abaixo de 6,8 pode implicar melhor estabelecimento de sua simbiose nas condições de acidez predominante nos solos ácidos tropicais (Howieson & Ewing, 1986). Além disso, condições de acidez no meio de cultivo e

nos inoculantes podem favorecer a pré-adaptação à acidez dos solos.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo verificar se o pH do meio de cultivo das estirpes e do inoculante turfoso pode favorecer o crescimento, a sobrevivência e a eficiência da sua simbiose com soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo constou de dois experimentos *in vitro* e um em casa de vegetação e foi desenvolvido no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras (MG), de julho de 1998 a julho de 1999.

Estirpes estudadas

Foram estudadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium*: duas estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e Br 29 = SEMIA 5019), lançadas como estirpes inoculante em 1968 e 1979, respectivamente, que são eficientes na simbiose com *Glycine max* (soja) e consideradas competitivas em solos de Cerrado (Peres & Vidor, 1980). A estirpe Br 4406, classificada como *B. japonicum* (Moreira et al., 1998), microssimbionte de *Enterolobium contortisilyquum*. (Vell) Morong (tamboril), vem-se destacando principalmente, pela tolerância à acidez (Ribeiro Jr. et al., 1986) e a metais pesados (Matsuda, 2000; Trannin et al., 2001). A estirpe INPA 03-11B, isolada de *Centrosema* sp em solos de terra firme da Amazônia, é eficiente em *Vigna unguiculata* (feijão caupi) (Magalhães, 1986) e, até o momento, não tem definição quanto à espécie.

Experimento I

Para avaliar o comportamento das estirpes em meio líquido com diferentes valores de pH, colônias isoladas de cada estirpe foram obtidas em meio YMA (yeast mannitol agar) (Vincent, 1970) e inoculadas em erlenmeyer que continha 250 mL de meio YM (yeast mannitol) com pH 5,0; 6,0 e 6,9 ajustado com solução de HCl 2 mol L⁻¹ e crescidas sob agitação orbital a 110 rpm a 28°C. A partir de 48 h de crescimento e a cada 24 h, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada cultura para determinação da densidade ótica a 560 nm em um espectrofotômetro B 395 (Micronal) e contagem do número de unidade formadoras de colônias (UFC) (Miles & Misra, 1938) pelo método de diluições sucessivas em solução salina (NaCl 0,55%) e inoculação em placas com YMA.

O número de UFC foi calculado por contagem direta do número de colônias nas placas em cada diluição, sendo obtidas equações de regressão pela relação do logaritmo do número de UFC por mililitro de meio de cultura de acordo com o tempo e densidade ótica. Assim, pela densidade ótica das culturas, pode-se comparar a produção de

polissacarídeos entre as estirpes, tomando-se o número base de 10^{8,8} UFC mL⁻¹ para todas as estirpes. Esse número foi determinado na fase log, na tentativa de obter somente células viáveis, diminuindo, assim, a interferência da fase estacionária (morte celular) nas leituras de densidade ótica.

Experimento II

Este experimento teve por objetivo estudar o efeito de inoculantes, produzidos com estirpes de *Bradyrhizobium* crescidas em diferentes valores de pH, na nodulação e no crescimento de plantas de soja da variedade CAC-1, cultivadas em casa de vegetação. O experimento constou de um delineamento inteiramente casualizado com quatro estirpes e três valores de pH (5,0; 6,0 e 6,9) com cinco repetições, além de um tratamento-testemunha com nitrogênio e outro sem nitrogênio, sendo ambos sem inoculação. Para o tratamento com nitrogênio, foi utilizado NH₄NO₃ como fonte de N, sendo aplicados 50 mg dm⁻³ de N no solo na semeadura e 150 mg dm⁻³ de N no solo 15 dias após.

Na produção dos inoculantes, curvas de regressão obtidas no primeiro experimento foram utilizadas para padronizar 10⁹ células mL⁻¹ de meio que foram misturados à turfa (50 mL de meio de cultura: 150 g de turfa). Os inoculantes foram aplicados às sementes na base de 500 g para 50.000 sementes. Foram plantadas duas sementes por vaso com desbaste posterior para uma planta por vaso.

Utilizou-se Latossolo Vermelho-Amarelo (LA) textura argilosa fase cerrado, coletado no município de Lavras (MG), na camada de 0-20 cm de profundidade, seco ao ar e peneirado em malha de 5,0 mm. Os resultados das análises químicas e físicas, seguindo método proposto por Vettori (1969) e modificado pela EMBRAPA (1979) e Camargo et al. (1986), encontram-se no quadro 1.

Para suprir a necessidade de calagem, foi adicionado calcário dolomítico, objetivando elevar o índice de saturação por bases (V) para 60%. O solo foi incubado por 15 dias, com teor de água em torno de 70% do volume total de poros (VTP). Passado o período de incubação, o solo foi seco ao ar e acondicionado em vasos de tubo de PVC com capacidade de 1,4 dm³. Para suprir a deficiência em nutrientes minerais, uma solução nutritiva foi adicionada, constituída de 200 mg kg⁻¹ de P (KH₂PO₄); 300 mg kg⁻¹ de K (K₂SO₄); 30 mg kg⁻¹ de Mg (MgSO₄.7H₂O); 0,5 mg kg⁻¹ de B (H₃BO₃); 1,5 mg kg⁻¹ de Cu (CuSO₄.5H₂O); 0,1 mg kg⁻¹ de Mo ((NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O); 5 mg kg⁻¹ de Zn (ZnSO₄.7H₂O) e 50 mg kg⁻¹ de S (contido nas fórmulas anteriores). O potássio foi parcelado em três aplicações iguais, uma no plantio e as outras aos 20 e 35 dias da emergência das plântulas.

As plantas foram colhidas durante o período da floração, 55 dias após semeadura, sendo a parte aérea cortada na altura do colo. O sistema radicular

Quadro 1. Características químicas e físicas do solo utilizado

Característica	Valor
pH, em água	5,5
Alumínio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,0
Fósforo, mg dm^{-3}	1,0
Potássio, mg dm^{-3}	75
Cálcio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	1,1
Magnésio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,6
Ac. potencial, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	4,0
Soma de bases, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	1,9
CTC efetiva, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	1,9
CTC a pH 7,0, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	5,9
Sat. bases, %	32,2
Sat. alumínio, %	0,0
Ferro, mg dm^{-3}	156,2
Zinco, mg dm^{-3}	5,4
Cobre, mg dm^{-3}	4,1
Matéria orgânica, dag kg^{-1}	3,71
Carbono, dag kg^{-1}	2,15
Areia, g kg^{-1}	560
Argila, g kg^{-1}	190
Silte, g kg^{-1}	250

Extratores: Ca, Mg e Al = KCl 1mol L⁻¹; P e K = Mehlich-1; (H + Al) = acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0; Mn, Fe, Zn e Cu = DTPA.

e os nódulos foram retirados cuidadosamente (evitando-se destacamento dos nódulos das raízes) do torrão formado para medir a atividade da enzima nitrogenase pelo método de redução de acetileno (Dilworth, 1966) em raízes intactas. Para isso, após lavagem, as raízes foram colocadas em frascos de 500 mL com tampa rosqueada e rolha de borracha, por onde foram retirados 10% do volume em ar da atmosfera do frasco e injetado o mesmo volume de acetileno (C₂H₄). Após incubação por duas horas, procedeu-se à injeção de 1 mL da amostra gasosa em um cromatógrafo a gás Variant 3400 CX. Então, os nódulos foram destacados manualmente do sistema radicular, contados e colocados para secar em estufa com circulação de ar a 60-70°C, para determinação da massa seca de nódulos, raízes e parte aérea.

Experimento III

Para avaliar o efeito do pH do inoculante, constituído do meio de cultivo e da turfa, na sobrevivência das estirpes, estas foram cultivadas em YM com pH ajustados para 6,0 e 6,9, até à obtenção de cerca de 10⁹ células mL⁻¹ e misturadas à turfa corrigida para valores de pH correspondentes.

A turfa utilizada foi cedida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) – EMBRAPA, local onde foi seca ao ar, passada em peneira de 200 mesh e analisada quimicamente (Quadro 2).

Quadro 2. Análise química da turfa

Característica	Valor
Nitrogênio, %	0,57
Carbono, %	16,04
pH	3,6
Alumínio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	0,3
Cálcio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	8,0
Magnésio, $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$	4,0
Fósforo, mg dm^{-3}	89
Potássio, mg dm^{-3}	610
Sódio, mg dm^{-3}	68

Para correção do pH da turfa, foi realizada uma curva de incubação com 1, 2, 3, 4, 5 e 6% de carbonato de cálcio (CaCO₃). Assim, foram adicionados 3,0 e 4,3% (v/v) de carbonato de cálcio para obtenção dos valores de pH 6,0 e 6,9, respectivamente.

Porções de 5 g de turfa com pH corrigido foram colocadas em sacos de polipropileno (10 x 15 x 0,06 cm), os quais foram lacrados em seladora a quente e autoclavados por duas vezes, durante uma hora a 121°C em intervalos de 24 h (Sparrow & Ham, 1983). Com o uso de seringas estéreis, 2 mL de cultura bacteriana com aproximadamente 10⁹ de células mL⁻¹ de meio foram injetados nos sacos de polipropileno. O local da perfuração foi limpo com algodão estéril embebido em álcool etílico 70% e coberto com fita adesiva esterilizada em autoclave. Manualmente, cada pacote (total = 30 pacotes/estirpes) foi agitado vigorosamente, para garantir a completa homogeneidade do inoculante, que foi, posteriormente, armazenado sob temperatura de 28-30°C (Figueiredo et al., 1991).

Foram realizadas as avaliações do número de unidades formadoras de colônias (UFC), aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias da inoculação, em três repetições (três pacotes de inoculante) de cada estirpe. Para isso, 5 g do inoculante foram colocados em erlenmeyer que continha 95 mL de solução salina (NaCl 0,55%) e agitados por um minuto, seguindo-se as diluições sucessivas em tubos com 9 mL da mesma solução (Vincent, 1970). Aliquotas de 0,02 mL a partir da diluição 10⁻⁴ até 10⁻⁹ foram inoculadas em placas com meio YMA e incubadas a 28°C durante sete dias.

Em todos os ensaios, após análise de variância, os dados foram comparados entre tratamentos pelo teste de Duncan ($p > 0,05$), empregando-se o Sistema de Análise Estatísticas e Genéticas (SAEG 5.0). O valor de F foi calculado e testado pelo programa Fcalc 32 versão 1.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* spp crescidas em meio líquido com diferentes valores de pH

O comportamento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi diferenciado em cada pH de cultivo, tendo todas as estirpes crescido melhor em pH 6,0 (Figura 1), onde alcançaram os maiores números de unidades formadoras de colônias. Em pH 5,0, a estirpe INPA 03-11B apresentou um crescimento menor em relação a pH 6,0 e 6,9 até 168 h. A partir deste tempo, o crescimento foi semelhante, chegando a superar os demais valores de pH testados. Esta diferença nas primeiras horas de crescimento pode ser devida à maior inibição do crescimento na fase log, proporcionada pela acidez mais elevada, indicando que a tolerância ao pH baixo é dependente da fase de crescimento (O'Hara & Glenn, 1994; Correa & Barnex, 1997). Keyser & Munns, (1979a,b) e Thornton & Davey (1983) também observaram um

aumento da fase log em estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido quando crescidas em pH 4,5. Já as estirpes Br 4406, Br 29 e SEMIA 587 tiveram comportamento semelhante em pH 5,0 e 6,9.

O tempo necessário para atingir crescimento máximo, obtido por meio das equações de regressões (Figura 1), também foi menor em pH 6,0, sendo de 146 h para Br 4406, 143 para Br 29, 155 para SEMIA 587 e 148 para INPA 03-11B (Quadro 3), indicando melhor adaptação das estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas ao pH levemente ácido. Os números de UFC em pH 5,0, em geral, foram semelhantes em relação ao pH 6,9, porém o tempo necessário para crescimento máximo foi diferenciado, exceto para SEMIA 587.

A densidade ótica é resultante do número de células somado à produção de exopolissacarídeos. Tomando como base um mesmo número de UFC ($10^{8.8}$ UFC mL⁻¹) para todas as estirpes na fase log e fazendo uso das equações de regressão da figura 2, foram obtidas densidades com diferenças relativas apenas à produção de polissacarídeos. A produção

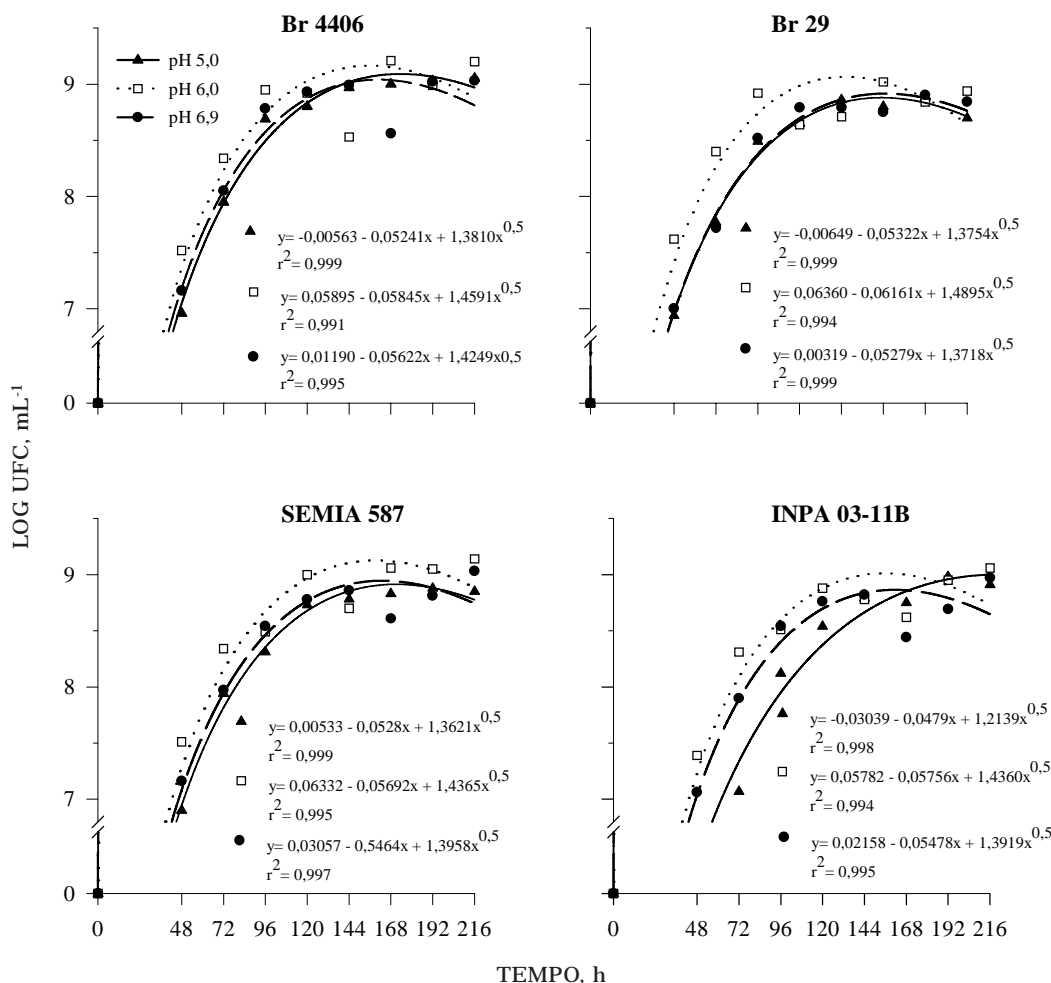


Figura 1. Comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido, considerando o pH de cultivo.

Quadro 3. Tempo necessário para o crescimento máximo de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* em meio YM (Vincent, 1970) com diferentes valores de pH

pH	Estirpe							
	Br 4406		Br 29		SEMIA 587		INPA 03-11B	
	Tempo (h)	UFC	Tempo (h)	UFC	Tempo (h)	UFC	Tempo (h)	UFC
5,0	165	9,09	159	8,88	161	8,91	210	9,00
6,0	146	9,16	143	9,07	155	9,13	148	9,01
6,9	154	9,04	165	8,92	161	8,95	152	8,86

de exopolissacarídeos foi diferenciada entre as estirpes conforme o pH de cultivo, sendo as maiores quantidades obtidas em pH 6,0 (Figura 3). Em pH 5,0 e 6,9, a estirpe Br 4406 que apresentou, de modo geral, maior número de UFC em relação às demais, também apresentou maior produção de exopolissacarídeos. Esses resultados estão em acordo com a proposta de Cunningham & Munns (1984a) de que a produção de polissacarídeos está associada à maior tolerância à acidez. Entretanto, de acordo com Neves et al. (1992), isolados de Br 33 (*B. japonicum*), após adaptação às condições de acidez em campo, diminuíram a quantidade de exopolissacarídeos. Segundo Graham et al. (1982), o acúmulo de exopolissacarídeos é o resultado da incompleta síntese da membrana externa. Assim, a produção de exopolissacarídeos é um investimento significativo em termos de gasto de energia sob condições de estresse de prótons, pois as células têm mais urgência no uso destes carboidratos em outras funções (Dilworth et al., 1999). Esses mesmos autores revelaram, ainda, que o fenômeno da "acid habituation", o qual envolve a síntese de várias proteínas, principalmente proteínas da membrana externa, e o controle do pH citoplasmático proporcionariam resistência à perda de nutrientes necessários à manutenção destes sistemas. Assim, num cultivo subsequente, as células crescidas em pH abaixo de 7,0 poderiam produzir maior número de UFC do que as crescidas em pH 7,0.

Assim, os resultados deste experimento demonstraram um comportamento diferenciado das estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido em função do pH, tanto em número de UFC quanto em produção de exopolissacarídeos. O melhor desempenho em pH 6,0 apresentado pelas estirpes estudadas pode estar relacionado com uma resposta adaptativa ao meio levemente ácido promovido pela produção de exopolissacarídeos.

Resposta da soja a inoculantes produzidos com estirpes cultivadas em diferentes valores de pH

O número de nódulos (NN), atividade da nitrogenase (Nase) e massa seca de nódulos (MSN),

raízes (MSR) e parte aérea (MSPA) de plantas de soja inoculadas com quatro estirpes de *Bradyrhizobium* crescidas em diferentes valores de pH e os tratamentos com e sem nitrogênio encontram-se no quadro 4.

A produção de MSPA e MSR, em geral, não diferiu entre as estirpes Br 29, SEMIA 587 e INPA 03-11B em relação ao pH de cultivo das estirpes. As maiores produções de MSR ocorreram no tratamento com nitrogênio, não diferindo da estirpe SEMIA 587 cultivada no pH 6,9, coincidindo com os maiores resultados para matéria seca da parte aérea nos mesmos tratamentos. As plantas inoculadas com a estirpe Br 4406 tiveram as menores produções, evidenciando a ineficiência dessa estirpe na simbiose com soja.

Com exceção do NN da estirpe INPA 03-11B, não houve influência do pH de cultivo das estirpes sobre as variáveis MSN e NN, estando os valores das estirpes Br 29, SEMIA 587 e INPA 03-11B de acordo com aqueles encontrados por Morote et al. (1990), Oliveira et al. (1991) e Peres et al. (1993), para estas variáveis. Segundo Vargas et al. (1982) e Vargas & Suhel (1980), para uma simbiose eficiente, uma planta de soja na época de florescimento deve apresentar entre 15 e 30 nódulos ou de 100 a 200 mg de nódulos secos.

Os menores valores para NN e MSN foram observados nos tratamentos com a estirpe Br 4406, recomendada como sendo de eficiência comprovada quando inoculada em *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) (Ribeiro Jr. et al., 1986) e capaz de crescer em meio de cultura com elevada acidez (Ribeiro Jr. et al., 1987). O baixo número de nódulos pode ser devido, provavelmente, à alta especificidade hospedeira apresentada pela soja. Alguns cultivares de soja apresentam grau considerável de especificidade quando inoculadas com determinadas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (Vidor et al., 1983). A especificação hospedeira é a habilidade de uma estirpe de rizóbio em promover a nodulação em espécies, variedades e, ou, cultivares de determinada espécie de leguminosa. No caso da soja, existe certo grau de seletividade (Peres & Vidor, 1980; Vidor et al., 1983).

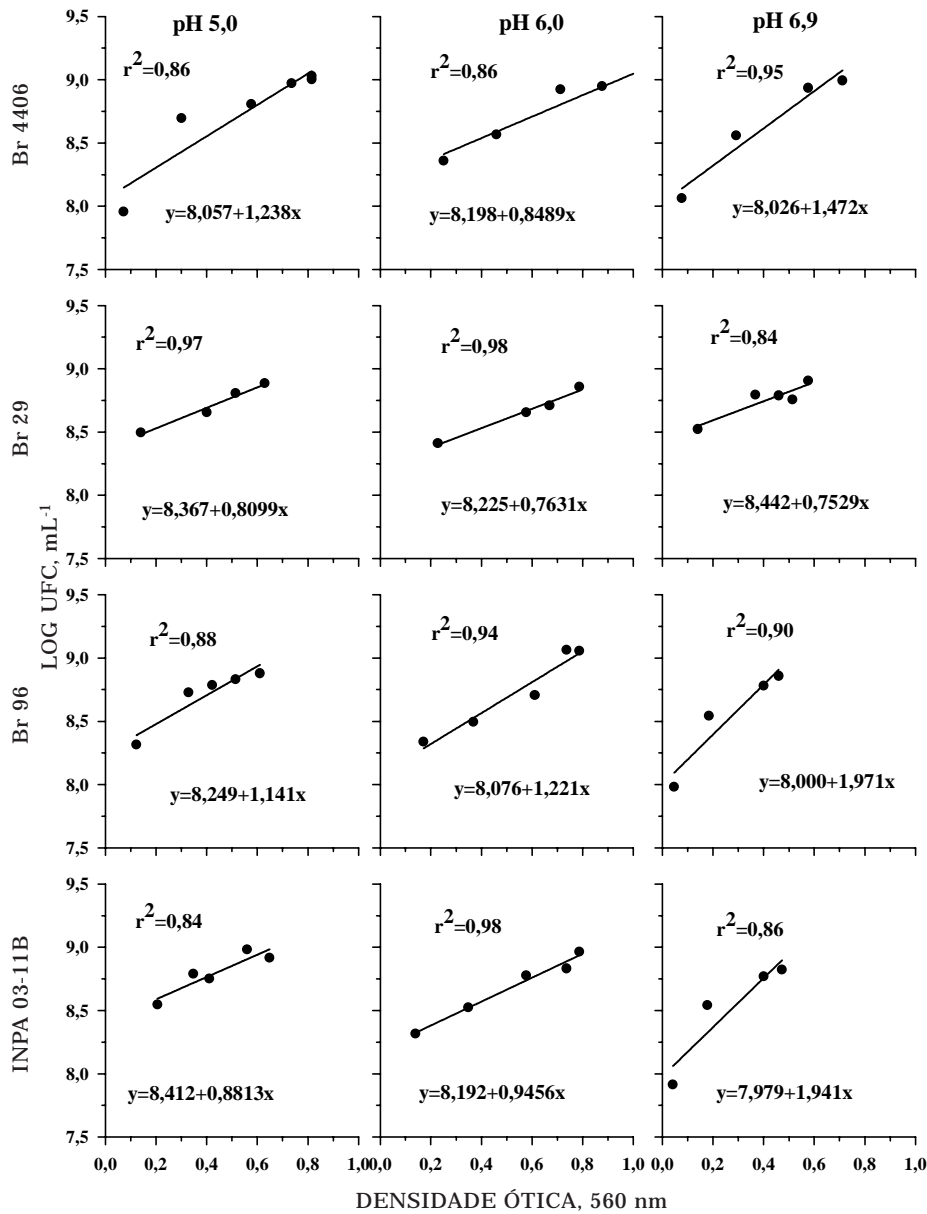


Figura 2. Relação entre o Log de UFC, considerando a densidade ótica das estirpes de *Bradyrhizobium* nos valores de pH 5,0; 6,0 e 6,9.

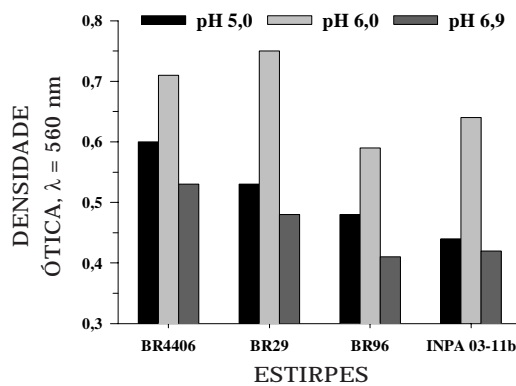


Figura 3. Densidade ótica de estirpes de *Bradyrhizobium* em $10^{8.8}$ UFC mL⁻¹, considerando o pH de cultivo.

Quadro 4. Número de nódulos, atividade da nitrogenase, massa de nódulos secos, massa da parte aérea seca e massa de raízes secas de plantas de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp crescidas em YM com diferentes valores de pH e aplicadas às sementes via turfa, bem como plantas não inoculadas com e sem adubação com nitrogênio

Tratamento		Número nódulo	Atividade/nitrogenase	Massa seca		
Estirpe	pH			Nódulo	Raiz	Parte aérea
			$\mu\text{mol s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$	g vaso^{-1}		
Br4406	5,0	2 e	83 cd	0,01 c	1,64 d	3,2 e
	6,0	1 e	12 d	0,00 c	1,63 d	2,9 e
	6,9	1 e	43 cd	0,01 c	1,72 d	3,4 de
Br29	5,0	55 abc	1.663 a	0,16 b	1,63 d	4,1 bc
	6,0	62 a	2.114 a	0,19 ab	1,85 cd	4,4 bc
	6,9	57 ab	2.437 a	0,19 ab	1,84 cd	4,7 ab
SEMIA 587	5,0	43 cd	223 bc	0,18 ab	1,81 cd	4,3 bc
	6,0	49 abc	220 bc	0,19 ab	1,83 cd	4,5 ab
	6,9	48 abc	657 b	0,24 a	2,24 ab	5,1 a
INPA 03-11B	5,0	44 bcd	1.662 a	0,18 ab	1,84 cd	4,6 ab
	6,0	36 d	1.566 a	0,24 a	2,16 abc	4,6 ab
	6,9	58 a	1.642 a	0,18 ab	1,83 cd	4,4 bc
	Com N	0 e	0 cd	0,00 c	2,40 a	4,8 ab
	Sem N	0 e	0 cd	0,00 c	1,98 bcd	3,9 cd

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Todavia, é interessante observar que a estirpe INPA 03-11B, isolada de *Centrosema* sp de solo ácido da Amazônia e eficiente para *Vigna unguiculata* (feijão caupi), mas que, até o momento, não havia sido testada quanto à sua eficiência em soja, apresentou uma resposta semelhante à das estirpes já recomendadas, Br 29 e SEMIA 587.

A atividade da Nase foi maior para as estirpes Br 29 e INPA 03-11B. Para todas as estirpes não houve diferença entre os tratamentos de inoculação com diferentes valores de pH.

Embora exista correlação positiva entre número ($r = 0,77^{**}$) e massa de nódulos secos ($r = 0,76^{**}$) e a atividade da nitrogenase, nem sempre os tratamentos que promoveram as maiores atividade de Nase apresentaram maior MSPA e MSR.

Os resultados deste experimento demonstraram o efeito da inoculação com as diferentes estirpes nas variáveis analisadas, embora, em geral, não tenham sido observadas diferenças em função do pH de cultivo das estirpes inoculadas. É possível que o principal fator responsável pela falta de resposta nos diferentes tratamentos de inoculação seja devido à não-correção da turfa para os valores de pH correspondentes aos do meio de cultivo. De qualquer forma, os resultados demonstraram que o uso do pH 6,0 no meio de cultivo de rizóbio utilizado para produção do inoculante em turfa não comprometeu a eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio.

Sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* spp cultivadas e inoculadas em turfa com diferentes valores de pH

No quadro 5, encontram-se os valores de UFC das estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas e inoculadas em turfa com diferentes valores de pH que sobreviveram após diferentes períodos de armazenamento.

Houve crescimento de todas as estirpes, logo nos primeiros 15 dias de armazenamento, quando, de modo geral, alcançaram máximos números de UFC nos dois valores de pH, permanecendo semelhantes em pH 6,9 até os 45 dias, exceto para Br 4406, que apresentou crescimento até os 30 dias. Em pH 6,0, a estirpe Br 29 foi a única que se manteve com números máximos até os 60 dias, enquanto Br 4406, SEMIA 587 e INPA 0311B decresceram, respectivamente, a partir de 45, 30 e 30 dias. Segundo Somasegaran et al. (1984), este aumento é um período de maturação também chamado de "cura", que ocorre devido à utilização de nutrientes ainda presentes no meio de cultura. Passado esse período, a população tende a decrescer e começa se estabilizar, dependendo das condições.

Em relação aos valores de pH de cultivo e de correção da turfa, percebeu-se que os números de UFC iniciais, calculados a partir da relação entre Log de UFC e densidade ótica (Figura 2), não diferiram, exceto para Br 4406 que, ao longo do período de armazenamento, apresentou menores

Quadro 5. Unidades Formadoras de Colônias (Log UFC, g⁻¹ inoculante) de estirpes de *Bradyrhizobium* spp, considerando o pH do inoculante turfoso (meio de cultura mais turfa) em cada período de armazenamento

Estirpe	pH	Período (dias)					
		0	15	30	45	60	75
Log UFC g ⁻¹							
Br 4406	6,0	8,06 Ae ⁽¹⁾	8,78 Bc ⁽²⁾	9,08 Bb	9,32 Ba	8,93 Bbc	8,48 Ad
	6,9	7,81 Be	9,66 Aab	9,81 Aa	9,56 Abc	9,46 Ac	8,60 Ad
Br 29	6,0	8,06 Ac	9,85 Aa	9,71 Bab	9,61 Aab	9,67 Aab	9,44 Ab
	6,9	8,19 Ac	9,87 Aa	9,97 Aa	9,82 Aa	8,82 Bb	8,92 Bb
SEMIA 587	6,0	7,95 Ae	9,83 Aa	9,70 Bab	9,41 Bc	9,53 Abc	9,20 Ad
	6,9	8,01 Ac	9,99 Aa	10,06 Aa	9,96 Aa	9,14 Bb	9,07 Ab
INPA 03-11B	6,0	7,95 Ad	9,86 Aa	9,73 Aa	9,46 Bb	9,22 Abc	9,15 Ac
	6,9	8,03 Ac	10,04 Aa	10,06 Ba	9,93 Aa	9,17 Ab	8,98 Ab

⁽¹⁾ Valores de UFC calculados a partir da relação entre o log de UFC a densidade ótica. ⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

números de UFC em pH 6,0 em relação a pH 6,9 até 60 dias, embora os números de UFC iniciais fossem maiores. Todavia, aos 75 dias, não houve diferença na UFC entre os dois valores de pH para esta estirpe. Um dos destaques dessa estirpe é a produção de exopolissacarídeos sob estresse (Figura 3). Segundo Dilworth et al. (1999), sob condições de acidez, a produção de exopolissacarídeos pode-se tornar mais um fator de estresse. Entretanto, considerando que este também pode ser um fator de adaptação à acidez, o investimento em exopolissacarídeos como forma de tolerância a este estresse parece ser o mecanismo que, ao final dos 75 dias, garante números de UFCs semelhantes nos dois valores de pH.

De modo geral, as estirpes mantiveram a tendência de maiores números de UFC em pH 6,9 até 45 dias. Ao final dos 75 dias não diferiram, exceto para Br 29, que sobreviveu melhor em pH 6,0. Assim, os menores números de UFC em pH 6,0 até os 45 dias de armazenamento podem ser devidos à pré-adaptação ao pH levemente ácido (acid habituation), durante o cultivo em pH 6,0. O efeito da concentração de cálcio varia com o pH, entretanto, aumentando-se a concentração de cálcio, ocorre um aumento em termos de sobrevivência celular (Dilworth et al., 1999). A taxa de crescimento é estimulada pela presença do cálcio, sendo este efeito maior quando as células de rizóbio estavam sob estresse provocado pela acidez (Howieson et al., 1992; Reeve et al., 1993). Assim, embora a quantidade de cálcio usada para corrigir a turfa para pH 6,9 tenha sido maior, a concentração de cálcio teve efeito menor sobre pH alcalino e neutro. Ressalta-se que, no final

do experimento (75 dias), todas as estirpes apresentaram valores de UFC no inoculante superiores aos atualmente recomendados pela RELARE (10⁸ g⁻¹ inoculante).

Atualmente, tanto o pH da turfa como o do meio de cultivo das estirpes, usados para produção de inoculantes no Brasil e em outros países, são corrigidos para valor em torno de 6,8. Os resultados dos experimentos demonstraram que o pH de cultivo e o de correção da turfa influenciaram a sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* e mostraram a possibilidade do uso de inoculantes corrigidos para valor de pH 6,0, como modo de pré-adaptação das estirpes inoculantes à condição de acidez dos solos tropicais.

CONCLUSÕES

1. As estirpes de *Bradyrhizobium* (Br 4406, Br 29, SEMIA 587 e INPA03-11B) tiveram um comportamento diferenciado em meio líquido com pH 5,0, 6,0 e 6,9, obtendo melhor desempenho em pH 6,0, tanto em número de UFC quanto em produção de exopolissacarídeos.
2. A tolerância a pH 6,0 pode estar relacionada com a maior quantidade de exopolissacarídeos.
3. Os valores de pH 5,0, 6,0 e 6,9 utilizados no cultivo de rizóbio em inoculante turfoso não afetaram a eficiência simbiótica das estirpes em soja.

4. O melhor crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* em meio de cultivo com pH 6,0 e sua maior sobrevivência em turfa com pH corrigido para 6,0 indicaram como alternativa vantajosa o uso de inoculantes corrigidos para esse valor de pH.

LITERATURA CITADA

- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A. & VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1986. 94p.
- CORREA, O.S. & BARNEX, A.J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World J. Microbiol. Biotechnol., 13:153-157, 1997.
- CUNNINGHAM, S.D. & MUNNS, D.N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminum activity. Soil Sci. Soc. Am. J., 48:1276-1280, 1984b.
- CUNNINGHAM, S.D. & MUNNS, D.N. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. Soil Sci. Soc. Am. J., 48:1273-1276, 1984a.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophysiol. Acta, 127:285-294, 1966.
- DILWORTH, M.J.; RYNNE, F.G.; CASTELLI, VIVAS-MARFISI, A.I. & GLENN, A.R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. Microbiology, 145:1585-1593, 1999.
- DOBEREINER, J. & DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. R. Econ. Rural, 18:447-460, 1980.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Manual de métodos e análises de solos. Rio de Janeiro, 1979. 79p.
- FABER, J.M. & PAGOTTO, F. The effects of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Letters Appl. Microbiol., 15:197-201, 1992.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; STAMFORD, N.P. & BURITY, H.A. Efeito da temperatura de armazenamento na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. R. Bras. Ci. Solo, 15:173-178, 1991.
- FOSTER, J.W. & HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., 173:129-5135, 1991.
- GOODSON, M. & ROWBURY, R.J. Habituation to normally lethal acidity by prior growth *Escherichia coli* at a sub lethal acid pH value. Letters Appl. Microbiol., 8:77-79, 1989a.
- GOODSON, M. & ROWBURY, R.J. Resistance of acid-habituation *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. Letters Appl. Microbiol., 8:211-214, 1989b.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can. J. Microbiol., 38:475-484, 1991.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T. & PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. Field Crops Res., 5:121-128, 1982.
- HARTEL, P.G. & ALEXANDER, M. Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminum-rich soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 47:502-506, 1983.
- HOWIESON, J.G.; ROBSON, A. D. & ABBOTT, L.K. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. Aust. J. Plant Physiol., 19:287-296, 1992.
- HOWIESON, J.G. & EWING, M.A. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* Symbiosis. Aust. J. Agric. Res., 37:55-64, 1986.
- KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Effects of calcium, manganese, and aluminium on growth of rhizobia in acid media. Soil Sci. Soc. Am. J., 43:500-503, 1979a.
- KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium, and phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J., 43:519-523, 1979b.
- MAGALHÃES, F.M.M. Present state of knowledge on biological nitrogen fixation in Amazonia. In: SYMPOSIUM ON THE HUMID TROPICS, 1., Belém, 1986. Proceedings. Belém, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1986. v.1. p.499-512.
- MATSUDA, A. Tolerância "in vitro" e sobrevivência no solo de espécies de rizóbio de leguminosas tropicais a metais pesados. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000. 85p. (Tese de Mestrado)
- MILES, A.A. & MISRA, S.S. The estimations of the bacteriocidal power of the blood. J. Hyg., 38:732-749, 1938.
- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K. & YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. Molec. Ecol., 7:889-995, 1998.
- MOROTE, C.G.B.; VIDOR, C.; MENDES, N.G. & PEREIRA, J.S. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. R. Bras. Ci. Solo, 14:143-150, 1990.
- NEVES, M.C.P.; RAMOS, M.L.G.; MARTINAZZO, A.R.; BOTELHO, G.R. & DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. In: MULONGO, K.; GUEYE, M. & SPENCER, D.S.C., eds. Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture. Chichester, Wiley-Sayce, 1992. p.219-233.
- O'HARA, G.W. & GLENN, A.R. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. Arch. Microbiol., 161:286-292, 1994.
- O'HARA, G.W.; GOSS, T.J. DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol., 55:1870-1876, 1989.
- OLIVEIRA, J.C.; RAMOS, M.L.G. & DUQUE, F.F. Inoculação da soja, em solo de cerrado no primeiro ano de cultivo. R. Bras. Ci. Solo, 15:273-276, 1991.

- PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. & VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. R. Bras. Ci. Solo, 17:357-363, 1993.
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. R. Bras. Ci. Solo, 4:139-143, 1980.
- REEVE, W.G.; DILWORTH, M.J.; TIWARI, R.P. & GLENN, A.R. Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae WSM710 involves exoR. Microbiology, 143:1951-1958, 1997.
- REEVE, W.G.; TIWARI, R.P.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. Soil Biol. Biochem., 25:581-586, 1993.
- RIBEIRO Jr., W.Q.; FRANCO, A.A. & LOPES, E.S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. R. Bras. Ci. Solo, 10:219-225, 1986.
- RIBEIRO Jr., W.Q.; LOPES, E.S. & FRANCO, A.A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. R. Bras. Ci. Solo, 11:275-282, 1987.
- RICHARDSON, A.E. & SIMPSON, R.J. Acid-tolerance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium trifolii* associated with a *Trifolium subterraneum* L. based pasture growing in an acid soil. Soil Biol. Biochem., 21:87-95, 1989.
- SOMASEGARAN, P.; REYES, V.G. & HOBEN, H.J. The influence of high temperatures on the growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat inoculants during preparation, storage, and distribution. Can. J. Microbiol., 29:23-30, 1984.
- SPARROW, S.D. & HAM, G.E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. Agron. J., 75:181-184, 1983.
- THORNTON, F. C. & DAVEY, C.B. Acid tolerance of *Rhizobium* in culture media. Soil Sci. Soc. Am. J., 47:496-501, 1983.
- TRANNIN, I.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & LIMA, A.S. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". R. Bras. Ci. Solo, 25:305-316, 2001.
- VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R. & SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. Pesq. Agropec. Bras., 17:1127-1132, 1982.
- VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeitos da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja em um solo de cerrado. R. Bras. Ci. Solo, 4:17-21, 1980.
- VETTORI, L. Métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim técnico, 7)
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E. & PEDROSO, M.H.T. Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. Porto Alegre, IPAGRO, 1983. p.51 (Boletim técnico,1)
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. London, JBP, 1970. 164p. (Handbook, 15)

