

VII. MICROBIOLOGIA DO SOLO

NOTA

TOLERÂNCIA DE *BRADYRHIZOBIUM* SP. DE MIMOSOIDEAE À ACIDEZ EM MEIO DE CULTURA (1)

WALTER QUADROS RIBEIRO JÚNIOR (2, 5), AVÍLIO ANTONIO FRANCO (3)
e ELI SIDNEY LOPES (4, 5)

RESUMO

Foram realizados testes em meio de cultivo acidificado para avaliar a tolerância de 59 estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isolados de Mimosoideae. As culturas, por via de regra, apresentaram crescimento rápido e alcalinização do meio. Das estirpes testadas, dez apresentaram crescimento em meio com valor de pH 4,6 (três, crescimento rápido; um, médio e seis, lento). Destas, oito não induziram alteração visual na cor do indicador bromotimol-azul incluído no meio. A estirpe SMS-513, uma entre essas oito, promoveu acidificação no meio com valor de pH 6,2, sendo considerada tolerante à acidez. Algumas estirpes cresceram em meio de cultura acidificado, somente com alta concentração inicial de células.

Termos de indexação: rizóbios tolerantes à acidez; Mimosoideae; *Bradyrhizobium* sp.

(1) Trabalho recebido para publicação em 7 de outubro de 1986 e aceito em 6 de setembro de 1988.

(2) Pesquisador da EMGOPA, Rua 58, nº 94, Centro, 74000 Goiás.

(3) Pesquisador da EMBRAPA, UAPNPBS, km 47, 23851 Seropédica, RJ.

(4) Seção de Microbiologia do Solo, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(5) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

Diversos trabalhos mostram que a acidez elevada pode determinar má nodulação e baixos níveis de fixação de nitrogênio (GIBSON et al., 1975; ANDREW & JOHNSON, 1976; MUNNS, 1978; RICE et al., 1977; FRANCO & MUNNS, 1982).

A inoculação de leguminosas com estirpes isoladas e mantidas por repicagens sucessivas em meio de cultura com pH próximo à neutralidade pode também ser responsável por má nodulação nessas condições. É possível a utilização de leguminosas e *Rhizobium* que tolerem ou até prefiram condições de elevada acidez (LIE, 1971; SPAIN et al., 1975). Alguns trabalhos revelam que estirpes de *Rhizobium* selecionadas em meio de cultura para tolerância à acidez têm maior potencial de eficiência e sobrevivência em solos ácidos (GRAHAM et al., 1982; SILVA & FRANCO, 1984). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar estirpes de *Bradyrhizobium*, previamente isoladas em meio com valor de pH elevado para tolerância à acidez em meio de cultura.

Material e Métodos

Utilizaram-se, inicialmente, culturas de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de leguminosas da subfamília Mimosoideae que vinham sendo mantidas em meio de manitol levedura, com valor de pH próximo de 7,0 (Quadro 1). Todas as estirpes foram testadas para pureza. O inóculo constou de células provenientes de meio agarificado suspensas em solução 0,85% de NaCl. Esse inóculo foi riscado em placas com o mesmo meio, com valor de pH 4,5 e 6,2, e adição de azul-de-bromotimol. A partir do segundo dia de incubação a 28°C, observaram-se mudanças do valor de pH do meio e velocidade de crescimento. Este foi considerado rápido, médio ou lento, se as colônias surgissem, respectivamente, com 4, 5-6 e 7 ou mais dias. Posteriormente, usou-se o meio de cultura descrito por AYANABA et al. (1983) com pH 4,6 e 6,2. O meio com pH 4,6 foi preparado sem e com 25 µM de Al₂(SO₄)₃, e adicionado de 0,005% de verde-de-bromocresol. O meio com pH 6,2 não recebeu alumínio, mas 0,005% de bromocresol-púrpura. A solução de alumínio foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio, após esterilização deste. O pH do meio foi ajustado após esterilização, mediante soluções esterilizadas de H₂SO₄ ou KOH. Além das estirpes SMS-87, SMS-325, SMS-355, SMS-512 e SMS-515, indicadas no quadro 1, foram testadas as estirpes BR-4401 a BR-4409, recém-isoladas de *Enterolobium contortisiliquum*, BR-MI.1 e BR-3445, de *Mimosa laticifera*, e BR-5603, BR-5604, BR-5610 e BR-5611, de *Albizia lebbek*.

O inóculo foi preparado como anteriormente e transferido para meio de cultura diluído 1:5 em água e padronizado para cerca de dez bactérias por mililitro. Efetuou-se a inoculação com alça de platina calibrada, transferindo-se 40 µl das suspensões para placa, colocando-se doze inóculos em cada uma, com duas

repetições por tratamento. Testaram-se as mesmas culturas também nos meios com pH 4,6 e 6,2, usando-se alta concentração de inóculo (alça de platina com meio sólido). Empregou-se a estirpe BR-4405 para teste de crescimento, em meio líquido (KEYSER & MUNNS, 1979), sem indicador, em cinco níveis de acidez (pH ajustado para 4,6, 4,8, 5,0, 5,2 e 5,5), com quatro repetições. Cerca de 10^5 células foram inoculadas em 100ml dos meios em frasco erlenmeyer, e incubadas sob agitação. Foram efetuadas leituras diárias do pH e da densidade óptica (filtro de 410 nm).

Resultados e Discussão

No quadro 1, encontram-se os resultados do teste em meios com valor de pH 4,5 e 6,2.

A maioria das estirpes (62%) apresentou crescimento rápido em pH 6,2, e apenas 24%, crescimento lento. A maioria delas (76%) alcalinizou o mesmo meio, e apenas 22% o acidificou. Neste caso, as estirpes, de modo geral, tiveram crescimento rápido e capacidade de alcalinizar o meio. Essa característica parece ser comum em *Bradyrhizobium* sp. isolado de espécies da subfamília Mimosoideae.

Somente dez estirpes (20%) demonstraram crescimento em meio com valor de pH 4,5, sendo seis delas de crescimento lento.

O fato de terem sido isoladas e manuseadas sempre em meio com pH neutro não favoreceu a ocorrência da característica de tolerância à acidez. BROSE (1984) obteve resultados semelhantes com estirpes de *Leucaena leucocephala*. A maioria delas não mudou o pH do meio, ou a mudança foi muito pequena para que o indicador a detectasse no meio com pH inicial 4,5. Apenas duas (SMS-507 e SMS-545) mostraram ligeira alcalinização do meio, a julgar pela mudança de cor do indicador. A utilização de um indicador com viragem em pH mais baixo poderia indicar maior número de estirpes promovendo alterações no pH antes do aparecimento da colônia, conforme sugerido por AYANABA et al. (1983).

Das estirpes que cresceram em meio acidificado, apenas a SMS-513 não alcalinizou o meio de cultura em nenhum dos dois valores de pH inicial (4,5 e 6,2), como seria desejável para ser considerada tolerante à acidez; o indicador empregado (azul-de-bromotimol) talvez tenha prejudicado essa observação.

No segundo teste, nenhuma das estirpes cresceu em meio com valor de pH 4,6 com ou sem alumínio, quando inoculadas com baixa concentração de células; todas, porém, cresceram em pH 6,2 (Quadro 2) e a maioria delas (83%) alcalinizou o meio com valor de pH 6,2; nenhuma estirpe acidificou o meio (Quadro 2).

QUADRO 1. Velocidade de crescimento e alteração de pH observadas em meio agarificado, induzidas por *Bradyrhizobium* sp. cultivado em meio de manitol-levedura, com pH inicial de 4,5 e 6,2

Leguminosas de origem	Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> (1)	Crescimento e alteração do pH (2)	
		pH 4,5	pH 6,2
<i>Acacia mollissima</i>	SMS-87	-	RB
<i>Acacia mollissima</i>	SMS-512(BR.Am-1)	-	RB
<i>Acacia mollissima</i>	SMS-513(BR.Am-3)	LS	LA
<i>Albizia lebbek</i>	SMS-518(BR.Eb-2)	LS	RB
<i>Anadenanthera falcata</i>	I 1079A	-	LB
<i>Anadenanthera falcata</i>	I 1081A	LS	LB
<i>Anadenanthera falcata</i>	I 1081B	LS	LB
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	I 1092	-	RB
<i>Calliandra calothyrsus</i>	SMS-548A	-	RB
	SMS-548	-	RB
<i>Desmanthus virgatus</i>	SMS-347	-	LB
<i>Entada polyphyla</i>	SMS-517(BR.Ep-2)	-	MB
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	SMS-547	-	LB
<i>Erytrina speciosa</i>	SMS-508A	-	MB
<i>Erytrina speciosa</i>	SMS-508(BR.Es-1)	-	LS
<i>Erytrina speciosa</i>	SMS-509(BR.Es-4)	-	MB
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-140(CB948)	-	RB
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-436 (NGR-8)	-	RB
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-448	-	RB
<i>Leucaena diversifolia</i>	SMS-459(CIAT-1923)	-	RA
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-461(CIAT-1967)	-	RA
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-516(BR.LI-1)	-	RA
<i>Leucaena leucocephala</i>	SMS-462 (CB81)	-	RB
<i>Mimosa caesalpinafolia</i>	SMS-506(BR.x1)	-	RB
<i>Mimosa caesalpinafolia</i>	SMS-507A(BR.x18)	-	RA
<i>Mimosa caesalpinafolia</i>	SMS-507B(BR.x18)	LB	RA
<i>Mimosa distans</i>	SMS-386	-	RA
<i>Mimosa furfuracea</i>	SMS-325	-	RB
<i>Mimosa rigida</i>	SMS-387	LS	RB
<i>Mimosa</i> sp.	SMS-173	MS	MB
<i>Mimosa</i> sp.	SMS-345	-	RA
<i>Mimosa</i> sp.	SMS-545	RB	RB
<i>Mimosa</i> sp.	I 1071 0	-	LB
<i>Mimosa pudica</i>	SMS-355	-	RB
<i>Mimosa invisa</i>	SMS-354	RS	RB
<i>Mimosa invisa</i>	SMS-354B	RS	RB
<i>Piptadenia peregrina</i>	SMS-510(BR.Pp2)	-	RA
<i>Piptadenia peregrina</i>	SMS-511(BR.Pp4)	-	MB
<i>Pithecelobium edwalli</i>	SMS-383	-	RB
<i>Pithecelobium edwalli</i>	I 1076	-	MB
<i>Prosopis juliflora</i>	SMS-514(BR.Pj5)	-	LA
<i>Sesbania marginata</i>	SMS-515A(BR.Sm1)	-	RB
<i>Sesbania marginata</i>	SMS-515B(BR.Sm1)	-	RB
<i>Schrankia</i> sp.	SMS-346	-	RB

(1) Existentes na coleção do Instituto Agronômico, Campinas, SP.

(2) Crescimento L = lento; M = médio; R = rápido. Alteração observada no pH - A = acidificação; B = alcalinização; S = sem modificação.

QUADRO 2. Velocidade de crescimento e alteração do pH observadas em meio agarificado, induzidas por *Bradyrhizobium* cultivado em meio de AYANABA et al. (1983), com valor de pH inicial 6,2

Leguminosas de origem	Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	Tempo de crescimento (1)	pH após crescimento (2)
		dias	
<i>Acacia mollissima</i>	SMS-87	4	B
<i>Acacia mollissima</i>	SMS-512	6	B
<i>Albizia lebbek</i>	BR-5603	3	S
<i>Albizia lebbek</i>	BR-5604	3	S
<i>Albizia lebbek</i>	BR-5610	9	B
<i>Albizia lebbek</i>	BR-5611	9	S
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4401	4	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4402	4	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4403	5	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4404	5	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4405	4	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4406	4	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4407	4	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4408	6	B
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4409	2	B
<i>Mimosa furfuracea</i>	SMS-325	4	B
<i>Mimosa laticifera</i>	BR-3445	2	B
<i>Mimosa laticifera</i>	BR-MI.1	9	B
<i>Mimosa pudica</i>	SMS-355	4	B
<i>Sesbania marginata</i>	SMS-515	9	B

(1) Não houve crescimento em pH 4,6 em meio com ou sem alumínio com inóculo de baixa concentração de célula, mas houve com alta. A estirpe BR-5611 não cresceu, mesmo com alta concentração.

(2) B = alcalinização; S = sem modificação.

A produção de álcali ou ácido em meio de cultura é uma característica variável, dependendo dos componentes do meio (PARKER, 1971). Daí a necessidade de selecionar estirpes que, mesmo em baixa concentração (como normalmente ocorre nos solos), tolerem acidez, desenvolvendo-se sem necessidade de modificar o pH do meio. Estirpes de *Rhizobium* diferem na habilidade de crescer em solos e em meio de cultura ácido, e a tolerância à acidez não pode ser prevista por variações de pH em meio de cultura (MUNNS, 1978). A fase de crescimento de *Rhizobium* pode influenciar a produção de ácido ou álcali (COOPER, 1982).

Embora não se tenha empregado o mesmo conjunto de estirpes nos dois testes, com o método proposto por AYANABA et al. (1983), detectou-se maior proporção de estirpes que modificaram o pH do meio de cultura (Quadro 2). Com exceção da BR-5611, as estirpes cresceram em meio acidificado e também com alumínio, quando se usou inóculo com alta concentração de células (Quadro 2). Entre estas, BR-5610 e BR-4402 cresceram antes de induzir modificações aparentes no pH do meio de cultura, mas, posteriormente, induziram modificações. Por outro lado, as estirpes SMS-87, BR-4404, BR-4405, BR-4406 e BR-4407 cresceram em meio ácido com ou sem alumínio (somente com alta concentração de células iniciais), sem induzir modificações iniciais ou posteriores no pH do meio de cultura. Ao contrário das estirpes BR-5610 e BR-4402, devem ser mais tolerantes à acidez, não se descartando, entretanto, a hipótese de terem sido selecionados mutantes tolerantes à acidez existentes nos inóculos que foram usados com alta concentração de células. Convém notar que a estirpe BR-5611 não cresceu no meio com pH 4,6, mesmo com alta concentração de células no inóculo.

SILVA & FRANCO (1984) observaram que apenas 19 estirpes de leguminosas arbóreas, entre 211 testadas, apresentaram crescimento sem antes elevar o pH do meio.

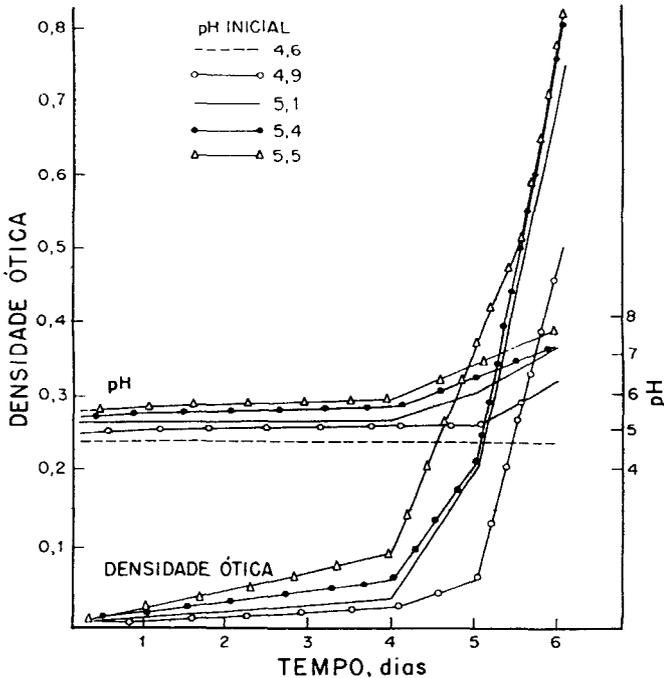


FIGURA 1. Crescimento de uma estirpe (BR 4405) de *Bradyrhizobium* em meio líquido com diferentes valores de pH e alterações do pH observadas nos respectivos meios.

No teste em meio líquido, com a estirpe BR-4405, não foi observado crescimento em pH 4,7 como ocorrera no meio sólido (Fig. 1). Nos outros níveis de pH, sempre houve aumento em relação ao valor do pH inicial do meio de cultura, confirmando a necessidade de a estirpe aumentar o pH para crescer.

Em estudos semelhantes, DATE & HALLIDAY (1978), e KEYSER & MUNNS (1979) verificaram crescimento das estirpes em meio ácido antes da mudança do pH no meio, indicando que elas seriam mais tolerantes que as aqui observadas. Dados sobre a utilização de algumas dessas estirpes para a inoculação da albizia (*Albizia lebbek*) e do tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) foram publicados recentemente (RIBEIRO JR. et al., 1986, 1987).

Conclusões

Das 59 estirpes testadas, apenas 10 cresceram em meio ácido, quando inoculadas com baixa concentração de células, e somente a SMS-513 cresceu sem modificar o pH do meio, com o indicador utilizado. Algumas estirpes cresceram antes de modificar o pH do meio apenas quando inoculadas em alta concentração de células.

SUMMARY

TOLERANCE OF MIMOSOIDEAE *BRADYRHIZOBIUM* SP. STRAINS TO ACIDITY IN CULTURE MEDIA

Fifty-nine *Bradyrhizobium* sp. strains isolated from Mimosoideae subfamily of Leguminosae were tested on acidified agar medium. Most strains were found to be fast growing and alcalinized the medium. Ten strains grew on pH 4.6; out of them, three were fast growing, six were slow growing and one was intermediate. Eight of the tested strains did not induce visual changes in the bromothymol-blue indicator. The strain SMS-513 acidified the medium with pH 6.2, and was considered acid tolerant.

Index terms: acid tolerant *rhizobia*, Mimosoideae, *Bradyrhizobium* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, C.S. & JOHNSON, A.D. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. 1 Nodulation and growth. *Australian Journal Agricultural Research*, Melbourne, 27:611-623, 1976.

- AYANABA, A.; ASANUMA, A. & MUNNS, D.M. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to aluminum. *Soil Science Society of the American Journal*, Madison, **47**:256-258, 1983.
- BROSE, E. Seleção de estirpes de *Rhizobium trifolii*, tolerantes a baixo pH, P e alto alumínio para trevo branco. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 12., Campinas, 1984. *Resumos*. p.58.
- COOPER, J.E. Acid production, acid tolerance and growth rate of Rhizobia in laboratory media. *Soil Biological and Biochemistry*, Elviford, **14**:127-131, 1982.
- DATE, R.A. & HALLIDAY, J. Selecting *Rhizobium* for acid infertile soils of the tropics. *Nature*, London, **277**:62-64, 1978.
- FRANCO, A.A. & MUNNS, D.M. Acidity and aluminum restraints on nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Soil Science Society of the American Journal*, Madison, **46**:296-301, 1982.
- GIBSON, D.I.; HAYES, P. & LAIDLAW, A.S. The influence of phosphate and lime on the growth and nitrogen fixation of *Lotus uliginosus* and *Trifolium repens* under greenhouse conditions. *Journal of the British Grassland Society*, Oxford, **30**(4):295-301, 1975.
- GRAHAM, P.M.; VITERI, F.M.; VARGAS, A.T. & PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research*, Amsterdam, **5**:121-128, 1982.
- KEYSER, M.M. & MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity aluminum and phosphate. *Soil Science Society of the American Journal*, Madison, **43**:519-523, 1979.
- LIE, T.A. Symbiotic N fixation under stress conditions. *Plant and Soil*, The Hague, 127-177, 1971. (nº especial)
- MUNNS, D.M. Soil acidity and nodulation. In: ANDREW, C.S. & KAMPRATH, E.J., ed. *Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils*. Austrália, CSIRO, 1978. p.264-274.
- PARKER, C.A. The significance of acid and alkali production by *Rhizobium* on laboratory media. In: LEGUME NODULATION CONFERENCE, 4., Canberra, 1971. *Proceedings*. Melbourne, CSIRO, 1971. 3p. (paper number eleven)
- RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; FRANCO, A.A. & LOPES, E.S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, **10**:219-225, 1986.
- ; 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. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, **11**:275-282, 1987.
- RICE, W.A.; PENNEY, D.C. & NYBERG, M. Effects of soil acidity on rhizobia numbers nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, **57**:197-203, 1977.
- SILVA, G.G. & FRANCO, A.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* sp. de leguminosas florestais, em meio de cultura, tolerantes à acidez e à toxidez do alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, **19**:169-174, 1984.
- SPAIN, J.M.; FRANCIS, C.A.; HOWELER, R.M. & CALVO, F. Differential species and varietal tolerance to soil acidity in tropical crops and pastures. In: BORMEMIZZA, E. & ALVARADO, A., eds. *Soil Management in Tropical America*. Cali, CIAT, 1975. p.308-347.