



ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS NATIVAS DO SEMIÁRIDO TOLERANTES A ESTRESSES AMBIENTAIS

Marcelo de Sousa Pinheiro¹, Juliani Barbosa de Sousa², Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini³, Suzana Cláudia Silveira Martins⁴, Claudia Miranda Martins⁴

¹Mestrando em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará

²Mestranda em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará

³Professora do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará

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

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Os rizóbios são bactérias que formam uma associação simbiótica com leguminosas na qual a planta fornece fotoassimilados e recebe nitrogênio fixado da atmosfera, sendo utilizado como alternativa ao uso de adubos nitrogenados. Objetivou-se com esse trabalho, isolar, caracterizar e testar sua resistência a estresses bióticos e abióticos *in vitro* de estirpes de rizóbios do Ceará e Rio Grande do Norte. Os isolados foram coletados, autenticados e caracterizados. As estirpes foram avaliadas em relação à tolerância a salinidade, temperaturas elevadas, pH extremos e resistência a antibióticos. A caracterização cultural permitiu identificar que 71% dos isolados tiveram capacidade de neutralizar ou alcalinizar o meio de cultura, e 31 dos tiveram velocidade de crescimento lenta, tal característica é geralmente associada a estirpes do gênero *Bradyrhizobium*. Após a autenticação foram obtidas 28 estirpes, dentre as quais a LAMAB 7, LAMAB 10 e LAMAB 21 destacaram-se por apresentarem melhor desempenho frente aos estresses abióticos e bióticos testados, portanto poderão ser promissoras candidatas ao uso como inoculantes para a cultura do feijão-caupi em regiões semiáridas.

PALAVRAS CHAVE: bactérias, *Bradyrhizobium*, Feijão-caupi

ISOLATION AND SCREENING OF RHIZOBIAL STRAINS NATIVE FROM SEMI-ARID TOLERANT TO ENVIRONMENTAL STRESS

ABSTRACT

Rhizobia are bacteria that form a symbiotic association with legumes in which the plant provides photosynthate and gets nitrogen from the atmosphere, being used as an alternative to the use of nitrogen fertilizers. The objective of this essay was to isolate, characterize and test, *in vitro*, biotic and abiotic stress resistance of rhizobia strains from the states of Ceará and Rio Grande do Norte. The isolates were collected, characterized and authenticated then the resistance test to salinity, high temperature, extreme pH conditions and antibiotics was performed. The phenotypic characterization identified that 71% of the isolates showed capability of neutralizing or alkalizing the culture medium, and 31 of the isolates had slow growth rate, this feature is usually associated with *Bradyrhizobium* genus strains. After authentication, 28 isolates were obtained and among them the LAMAB 7, LAMAB 10 and LAMAB 21 stood out for having better performance against abiotic and biotic stresses and

therefore they may be promising for use as inoculants for cowpea crop in semi-arid regions.

KEYWORDS: Cowpea bean, bacteria, *Bradyrhizobium*

INTRODUÇÃO

Com o grande volume de produtos químicos adotados na agricultura, a poluição da água e dos solos agrícolas tem se tornado um problema, por isso se buscam alternativas para a redução no uso destas substâncias; dentre elas estão os fertilizantes químicos, em especial o nitrogênio, um dos mais utilizados na agricultura, devido sua importância no crescimento das plantas, porém o uso excessivo pode trazer inúmeros danos ao meio ambiente (JADOSKI et al., 2010). Como forma de reduzir este problema, a adoção da simbiose rizóbio-leguminosa é um exemplo de associação biológica com grandes benefícios para sustentabilidade do ambiente, podendo substituir parcial ou totalmente o uso de adubos nitrogenados (BARROS et al., 2013).

Os rizóbios são um grupo de bactérias capazes de se associar com espécies leguminosas formando uma associação simbiótica na qual a planta fornece fotoassimilados a bactéria e recebe nitrogênio fixado da atmosfera. Estas bactérias apresentam uma grande diversidade fenotípica e taxonômica em vários grupos distribuídos pelo mundo (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012).

A cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é de grande importância para as regiões Norte e Nordeste do Brasil por ser uma das principais fontes proteicas, além de ter reduzido custo de produção. Estudos mostram que a inoculação do feijão-caupi com rizóbio pode gerar incrementos de produção, se assemelhando ao uso de adubação nitrogenada (CHAGAS JUNIOR et al., 2010). O incremento de produtividade de grãos de feijão-caupi BR 17 Gurguéia foi observado por COSTA et al. (2011) no polo produtivo de Bom Jesus (PI) inoculado com as estirpes INPA3-11B e UFLA 3-154 que geraram uma produção de 1.223kg ha⁻¹ e 1.016 kg ha⁻¹ respectivamente, sendo este próximo ao tratamento nitrogenado (70 kg ha⁻¹) com produção de 1.605 kg ha⁻¹. Dessa forma a fixação biológica de nitrogênio mostra-se como uma alternativa de baixo custo podendo ser facilmente utilizada por pequenos produtores.

A eficiência da associação rizóbio-leguminosa é condicionada não somente a combinação da estirpe bacteriana e a variedade cultivada, mas também com as condições ambientais onde a simbiose ocorre (FERREIRA et al., 2012). Os solos cultivados com o feijão-caupi de maneira geral são salinos e apresentam limitações referentes a acidez e fertilidade, fatores estes que afetam diretamente a simbiose, como também temperaturas elevadas, níveis tóxicos de alumínio e presença de antibióticos produzidos por outros micro-organismos do solo (SOUSA et al., 2013; FERNANDES et al., 2013).

A salinidade é um dos principais fatores adversos que podem ser encontrados nos solos de regiões semiáridas. Seus efeitos podem se manifestar como inibição do processo de nodulação, diminuindo a colonização nas raízes das leguminosas (VENTORINO et al., 2012). O pH do solo por sua vez também constitui um fator limitante a simbiose rizóbio-leguminosa pois afeta a multiplicação, e a sobrevivência dos rizóbios e também a nodulação e a fixação de nitrogênio (RUIZ-DÍEZ et al., 2012). As estirpes obtidas de solos ácidos, geralmente apresentam maior tolerância ao pH ácido do que outras estirpes obtidas de solos alcalinos, mostrando correlação entre a origem dos isolados e sua tolerância a acidez (MOREIRA, 1994).

A nodulação, tamanho e estrutura dos nódulos além da concentração de leghemoglobina podem ser afetados diretamente por temperaturas elevadas (DART & MERCER, 1965), diminuindo sobrevivência e estabelecimento da bactéria. Há relatos sobre bactérias isoladas de regiões semiáridas serem mais tolerantes a estresses térmicos (XAVIER et al., 2007). O estudo da resistência dos rizóbios a antibióticos é amplamente usado como parâmetro de classificação dos rizóbios além de servir como indicador para a presença de actinobactérias no solo onde foram isolados os rizóbios (MARTINS et al., 1997).

Os dados da literatura fornecem informações sobre a importância das avaliações de estirpes de rizóbio em função de diferentes faixas de pH's, tolerância a diferentes concentrações salinas, temperaturas elevadas, resistência intrínseca à antibióticos e utilização de fontes de carbono, sendo adotadas como critérios de seleção de estirpes promissoras para futuros inoculantes (HERNÁNDEZ et al., 2012).

Partindo dessa premissa, objetivou-se, com este trabalho, isolar estirpes de rizóbios de regiões semiáridas os caracterizando culturalmente e avaliar seu comportamento frente à salinidade, temperaturas elevadas, valores de pH extremos e resistência a antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de coleta

As amostras de solo foram coletadas nos municípios de Quixadá (4°58'S a 39°1'W) e Cascavel (4°7'S a 38°14'W), no Ceará, e no Rio Grande do Norte nos municípios Jardim de Angicos (5°39'S a 35°58'W) e Santana do Mato (5°57'S a 36°39'W). As amostras foram coletadas na profundidade 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 feita 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.

Efetou-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 erlemeyer que em seguida recebeu uma pequena porção da cultura 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 verificada a formação de nódulos radiculares e a presença de leghemoglobina no interior do nódulo, que indica atividade da enzima nitrogenase. Os isolados após confirmação da autenticidade foram incorporados a coleção de culturas de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Tolerância à salinidade

As estirpes de rizóbio foram submetidas à avaliação da tolerância a salinidade “*in vitro*”. Os isolados foram inoculados em 50 mL de caldo Yeast Mannitol (YM), com pH 6,8 e mantidos sobre agitação a 150 rpm, 28° C para crescimento da cultura. Segundo NÓBREGA et al. (2004) o tempo de crescimento das bactérias que nodulam leguminosas são de três dias para as estirpes de crescimento rápido ou intermediário e seis dias para as estirpes de crescimento lento. Após o crescimento, foi transferida uma alíquota de 1 mL de cultura para microtubos de 1,5 mL esterilizados. Os microtubos foram centrifugados a 8000 rpm durante 4 minutos descartando o sobrenadante. Utilizou-se a solução salina (NaCl 8,5 g L⁻¹) para ressuspender as células que foram novamente centrifugadas e descartado o sobrenadante. Repetiu-se o processo de lavagem três vezes. Foi retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada microtubo contendo a suspensão de células lavadas com solução salina. Em seguida, procedeu-se a inoculação em placas de Petri contendo meio YMA modificado com adição de NaCl. As concentrações de NaCl utilizadas em cada tratamento foram 1; 2; 2,5; 3; 10; 20; 30 e 50 g L⁻¹. Foi utilizado como controle o meio YMA com sua composição original. Cada tratamento teve três repetições e utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. As placas foram incubadas a 28° C durante 10 dias. Após esse período foi verificado se houve ou não crescimento das estirpes. Utilizou-se como referência as estirpes padrões 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*).

pH

A capacidade das estirpes em tolerar valores extremos de pH foi feito em triplicata, para cada isolado 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.

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

Ao concluir a caracterização cultural, observou-se que 71% dos isolados apresentaram capacidade de alcalinizar o meio de cultura ou mantê-lo neutro, e 31 dos 36 isolados testados tiveram lenta velocidade de crescimento, tal característica é geralmente associada a estirpes do gênero *Bradyrhizobium* que comumente nodulam o feijão-caupi (MELLONI et al., 2006), porém o mesmo comportamento não foi observado por MEDEIROS et al. (2009) que obtiveram 304 isolados de rizóbio oriundos dos municípios Alto do Rodrigues, Caicó, Carnaúbas, Ceará-Mirim, Mossoró e Nova Esperança do Estado do Rio Grande do Norte (RN), sendo em sua maioria bactérias que apresentavam crescimento rápido acidificando o meio de cultura. Segundo SANTOS et al. (2007) esta característica pode ser relacionada a estratégias de sobrevivência dos rizóbios em regiões semiáridas, em que os de crescimento rápido se multiplicam mais rapidamente que os rizóbios de crescimento lento e são mais tolerantes a seca.

Foi gerado um dendrograma de similaridade (Figura 1) no qual foram obtidos 7 grupos ao nível de 60% de similaridade. O grupo I é composto por três estirpes, onde todos tem crescimento lento, reação do pH do meio é neutra, consistência do muco viscosa e cor da colônia branca, o grupo II, com cinco isolados, difere pelo fato

de que 20% dos isolados apresentam reação ácida e o restante é neutra e todos os isolados tem consistência gomosa. O grupo VI tem apenas um isolado com crescimento lento, reação neutra, consistência butírica e cor amarela. Já o grupo VII tem cinco isolados e todos com crescimento rápido, acidificam o meio, consistência butírica e 80% tem cor amarela. De acordo com LEITE et al. (2009) estas características são típicas dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. Os demais grupos tiveram comportamento variável.

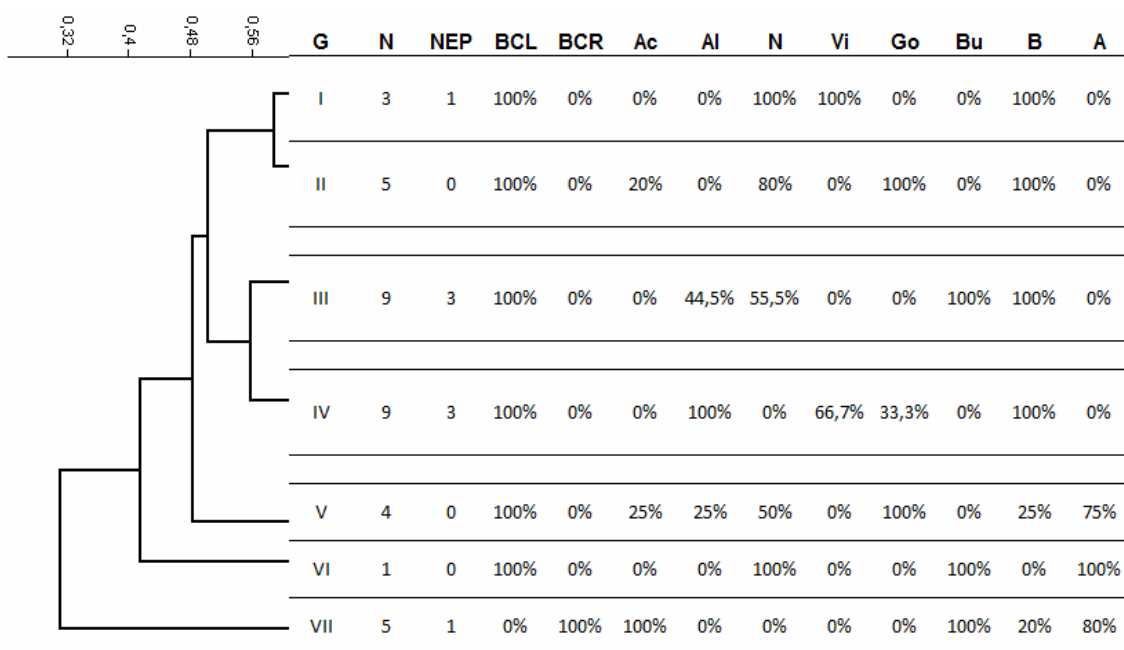


FIGURA 1: Dendrograma de caracterização cultural, gerado a partir do agrupamento de 28 estirpes oriundas de nódulos radiculares de feijão-caupi e as estirpes padrões BR 3471, BR 3486, BR 3301, BR 3302, BR 3267, BR 3262, BR 2003 e BR 2801, método de agrupamento UPGMA. (G) grupo referente, (N) número de isolados que compõem o grupo, (NEP) número de estirpes padrões, (BCL) bactérias de crescimento lento, (BCR) bactérias de crescimento rápido, (Ac) percentagem de isolados que acidificam o meio, (Al) percentagem de isolados que alcalinizam o meio, (N) percentagem de isolados 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

As estirpes padrões cresceram em pH 10 assim como 71% das estirpes de rizóbio, porém quando as mesmas foram submetidas ao pH 4 somente 75% dos padrões e 32% das estirpes apresentaram resultado positivo, indicando a influência do pH baixo sobre a bactéria (Tabela 1). Estudos relatam que as bactérias fixadoras de nitrogênio crescem em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0 e uma pequena quantidade cresce em um pH menor que 5,0 (RODRIGUES et al., 2006; ALI et al., 2009).

Este fato pode ser reforçado por RUFINI et al. (2011), que afirmaram que a simbiose rizóbio-leguminosa é favorecida por um aumento do pH do solo,

especialmente no caso do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Esses autores afirmam que estirpes submetidas a condições de estresse durante a produção de inoculante, apresentam resultados satisfatórios em relação à sobrevivência e eficiência simbiótica em campo, funcionando dessa forma como um processo adaptativo. Respostas similares foram obtidas por KENENI et al. (2010) que testaram cinco estirpes nativas rizóbios de feijão-fava do Norte da Etiópia região de solos predominantemente ácidos e todas resistiram ao pH 4,0.

Em relação à temperatura, 32 estirpes cresceram a 39 °C, porém à medida que houve acréscimo na temperatura o número de estirpes capazes de apresentar crescimento foi reduzido, e a 45 °C apenas 11 estirpes cresceram, das quais duas eram estirpes padrões de *Bradyrhizobium sp.* a BR 3301 e BR 3302 (Tabela 1). Isolados oriundos do sul de Minas Gerais foram testados por FLORENTINO et al. (2010) em relação a temperaturas elevadas e apresentaram crescimento até 36°C, já a 40 °C somente duas estirpes, de um total de de z, não foram capazes de crescer e quando foram submetidas a 45 °C nenhuma apresentou crescimento.

Outros trabalhos também mostram que os rizóbios em geral, crescem bem até aproximadamente 40 °C, valores superiores reduzem drasticamente suas capacidades de crescimento (SINGH et al., 2013). Esta resposta diferencial mostra que a resistência à temperatura, esta ligada a adaptação dos rizóbios locais aos níveis térmicos encontrados nas regiões em que os mesmos são isolados.

Na concentração de 3 g L⁻¹ de NaCl os resultados positivos foram observados em 31 estirpes. A partir da concentração de 10 g L⁻¹ a limitação tornou mais severa e apenas 14 estirpes cresceram. Nas maiores concentrações de NaCl utilizadas 30 g L⁻¹ e 50g L⁻¹ nenhuma das estirpes testadas foi capaz de sobreviver, sendo a concentração 20 g L⁻¹ de NaCl a maior concentração onde ainda foi observado o crescimento, com apenas duas estirpes apresentando resultado positivo (Tabela 1). Uma maior adaptação a este tipo de estresse foi observado por FERNANDES JÚNIOR et al. (2012) ao isolaram 27 estirpes de rizóbios em nódulos radiculares de guandu (*Cajanus cajan*) cultivados no Estado do Rio de Janeiro, observaram 11 estirpes capazes de tolerar até 3% (30g L⁻¹). O estresse salino além de afetar diretamente o crescimento da bactéria, pode também reduzir a nodulação por meio de inibição na planta hospedeira, pois sob condições de estresse as plantas produzem grandes níveis de etileno, hormônio gasoso envolvido em diferentes respostas aos estresses, e em várias espécies de plantas o etileno funciona como um regulador negativo da nodulação (JOUYBAN, 2012; SHALLER, 2012).

No geral, entre as estirpes testadas, obtiveram-se dez que foram resistentes a pelo menos dez antibióticos, no qual seis eram estirpes padrões, a estirpe padrão BR 3302 foi resistente a todos os antibióticos. Apenas uma estirpe nativa, LAMAB 12, proveniente de Cascavel (CE), foi capaz resistir aos 14 antibióticos testados.

TABELA 1: Comportamento de 28 estirpes de rizóbios e padrões aos estresses abióticos e bióticos.

| | Níveis de sais | | | | | | pH do meio | | temperatura | | | | Número de antibióticos |
|---------|----------------|---------|---------|---------|----------|----------|------------|-------|-------------|------|------|------|------------------------|
| | 1,0 g/L | 2,0 g/L | 2,5 g/L | 3,0 g/L | 10,0 g/L | 20,0 g/L | pH 4 | pH 10 | 39°C | 41°C | 43°C | 45°C | |
| L-1 | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 6 |
| L-2 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - | 8 |
| L-3 | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | 1 |
| L-4 | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | 8 |
| L-6 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 8 |
| L-7 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | 10 |
| L-8 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | 5 |
| L-9 | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | 5 |
| L-10 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | 12 |
| L-11 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | 6 |
| L-12 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | 14 |
| L-13 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 5 |
| L-14 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 5 |
| L-15 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 5 |
| L-16 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 6 |
| L-17 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | 8 |
| L-18 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 6 |
| L-19 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | 8 |
| L-20 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 5 |
| L-21 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | 9 |
| L-22 | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | 3 |
| L-23 | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | 7 |
| L-24 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | 8 |
| L-25 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | 5 |
| L-26 | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | 6 |
| L-27 | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | 3 |
| L-29 | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | 10 |
| L-30 | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | 5 |
| BR 3486 | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | 2 |
| BR 3471 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | 10 |
| BR 3301 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | 11 |
| BR 3302 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | 15 |
| BR 3262 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | 14 |
| BR 3267 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | 8 |
| BR 2801 | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 13 |
| BR 2003 | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 10 |
| Total | 36 | 36 | 34 | 31 | 12 | 3 | 15 | 28 | 32 | 22 | 17 | 11 | |

Legenda: Sinal de (+) indica crescimento da estirpe, (-) ausência de crescimento. Na última coluna, mostra a quantidade de antibióticos que a referida estirpe foi resistente.

Verificou-se que a aztreonam induziu a maior percentagem de resistência (97,3%) nas estirpes, enquanto que a amicacina apresentou a menor percentagem (13,51%). Em relação a ampicilina 59,46% mostraram resistência e 78,37% ao cloranfenicol.

Um total de 16 isolados de feijão guandu provenientes dos tabuleiros costeiros de Sergipe foram testados por FERNANDES & FERNANDES (2000) que observaram resistência elevada aos antibióticos tetraciclina, ampicilina, kanamicina e cloranfenicol. Em contrapartida FERNANDES Jr et al. (2012) ao testarem 27 isolados de feijão guandu oriundos do Estado do Rio de Janeiro contra quatro antibióticos verificaram que 31% dos isolados testados tiveram alta resistência a ampicilina e nenhum a cloranfenicol, sendo que apenas 4 foram resistentes a estreptomicina e nenhum resistente aos demais antibióticos.

Actinobactérias oriundas de solos de cerrado foram capazes de causar antagonismo em algumas estirpes de rizóbios para soja, chegando a 20,3% a percentagem destes sobre a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 33 e valores menores para outras estirpes (PEREIRA et al., 1999). Tal comportamento mostra a importância da avaliação da resistência dos rizóbios aos antibióticos tendo em vista a capacidade das actinobactérias de o produzirem naturalmente, o que pode impedir a uma estirpe produtiva e competitiva, obter êxito em uma região.

Bactérias de crescimento lento são mais tolerantes a diferentes antibióticos (DOWDLE & BOHLOOL, 1985), o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, onde as bactérias de crescimento lento mostraram-se mais tolerantes aos antibióticos testados. Ao avaliar isolados de crescimento rápido oriundos de solos de áreas áridas da Tunísia, REJILI et al. (2014) observaram resistência de rizóbio a baixas concentrações de ampicilina, no entanto FORTE et al. (2012) obtiveram melhores resultados com isolados de *Canavalia ensiformis* de crescimento rápido com os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. A capacidade de alguns rizóbios de crescerem na presença de uma variedade de antibióticos, proporciona vantagens adaptativas favorecendo competição local na rizosfera e, portanto, colonização das raízes de leguminosas, impedindo o estabelecimento de micro-organismos fitopatogênicos.

CONCLUSÃO

As estirpes apresentam atributos condizentes com o gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes LAMAB 7, LAMAB 10 e LAMAB 21 apresentam melhor desempenho aos estresses abióticos e bióticos testados.

REFERÊNCIAS

ALI, S. F.; RAWAT, L. S.; MEGHVANSI, M. K.; MAHNA, S. K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p.13-18, 2009.

BARROS, R. L. N.; OLIVEIRA, L. B.; MAGALHÃES, W. B. M.; MÉDICI, L. O.; PIMENTEL, C. Interação entre inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada de plantio na produtividade do feijoeiro nas épocas da seca e das águas, **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1443-1450, 2013.

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

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi no Cerrado, Gurupi-TO, **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.

COSTA, E. M.; NOBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbios em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

DART, P. J.; MERCER, F. V. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.16, p.321-328, 1965.

DOWDLE, S. F.; BOHLOOL, B. B. Predominance of Fast-Growing *Rhizobium japonicum* in a Soybean Field in the People's Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.5, p.1171-1176, 1985.

FERNANDES JUNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, 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, A. R.; FONSECA, M. R.; BRAZ, A. M. S.; Produtividade de feijão caupi em função da calagem e fósforo. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 54-62, 2013.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 24, n. 2, p.321-327, 2000.

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 Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1947-1959, 2012.

FLORENTINO, L. A.; SOUSA, P. M.; SILVA, J. S.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciências Solo**, v. 34, n. 4, p. 1113-1123, 2010.

FORTE, I. H.; GARCÍA, M. C. N.; HERNÁNDEZ, G. P.; JENQUI, P. R. R.; GORDILLO, R. B.; PEDROSO, J. F. R. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. **Cultivos Tropicales**, v. 33, n. 4, p. 21-28, 2012.

HERNÁNDEZ, J.L.; HINOJOSA, J.G.; MILIAN, P.E. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajera em el Centro Biotecnológico del Caribe. **Revista Colombiana de Microbiología Tropical**, v. 2, n.2, p. 51-62, 2012.

JADOSKI, S. O.; PRADO, C; LOPES, E. C; SALES, L. L. S. R. Características da lixiviação de nitrato em áreas de agricultura intensiva. **Pesquisa Aplicada a Agrotecnologia**, v. 3, n.1, p. 193-200, 2010.

JOUYBAN, Z. Ethylene biosynthesis. **Technical Journal Engineering Applied Sciences**, v. 1, p. 107-100, 2012.

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, p. 1215-1226, 2009.

LYRA, M. C. C. P.; 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 biotechnology**, v. 12, n. 17, p. 2147-2156, 2013.

MARTINS, L. M. V.; NEVES M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 1005-1010, 1997.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. R. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

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

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico em espécies arbóreas. In. ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed). **Microrganismo de Importância Agrícola**. Brasília. Embrapa: SPI. 1994. p. 121-150.

NÓBREGA, R. S. A. MOTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

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.

REJILI, M.; MAHDHI, M.; DOMÍNGUEZ-NÚÑEZ, J. A.; MARS, M. The phenotypic,

phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating *Lotus* sp. in Tunisian arid soils. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p.355-362, 2014.

RODRIGUES, C. S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, v.53, p.1-7, 2006.

RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. 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.

RUIZ-DÍEZ, B.; FAJARDO, S.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUA, 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. 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.

SCHALLER, G. E. Ethylene and the regulation of plant development. **BioMed Central Biology**, v. 10, n. 9, p. 1-3, 2012.

SINGH, S. K.; JAISWAL, S. K.; VAISHAMPAYAM, 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.

SOUSA, J. R. M.; ANDRADE, E. M. G; FURTADO, G. F.; SOARES, L. A. A.; SILVA, S. S.; SOUSA JÚNIOR, J. R. Crescimento vegetativo do feijão caupi sob doses de nitrogênio irrigado com águas salinas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.9, n.3, p 94-98, 2013.

VENTORINO, V.; CAPUTO, R.; PASCALE, S.; FAGNANO, M.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. **Annals of Microbiology**, v. 62, p.811-823, 2012.

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

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. 1-9, 2007.