

CYBELLE SOUZA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SABIÁ NATIVOS DE
UM ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

RECIFE

2011

CYBELLE SOUZA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SABIÁ NATIVOS DE
UM ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
do Solo da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como partes dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências do Solo.

RECIFE

2011

CYBELLE SOUZA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SABIÁ NATIVOS DE
UM ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
do Solo da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como partes dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências do Solo.

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 20 de Julho de 2011.

Orientador:

Mário de Andrade Lira Júnior – Ph.D

Examinadores:

Ana Dolores Santiago de Freitas – Dra.

Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra – Dra.

Maria Luíza Ribeiro Bastos da Silva – Dra.

Ficha catalográfica

O48a Oliveira, Cybelle Souza de
Diversidade fenotípica de rizóbios isolados de sabiá nativos
de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais / Cybelle
Souza de Oliveira – 2011.
75 f. : il.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior

Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Recife, 2011.

Inclui referência e apêndice.

1. Diversidade 2. Rizóbios 3. Sabiá I. Lira Junior, Mario de
Andrade, orientador II. Título

CDD 631.4

Aos meus pais, Erivaldo N. Oliveira e Rejane M. S. Oliveira, e minha irmã Bruna R. S. Oliveira, pela nossa união e por sempre terem acreditado em mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

E a minha avó, Olívia M. Souza, por sua eterna paciência e dedicação.

DEDICO

A meu esposo Jean C. B. Santos, pelo amor, companheirismo, apoio e paciência em todos os momentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar meu caminho, concedendo-me a realização de mais um sonho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, pela minha formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo.

Ao professor Mario de Andrade Lira Junior, pela orientação e pela contribuição proporcionada a minha vida acadêmica.

A minha avó Olívia, minha mãe e minha irmã, por serem guerreiras e terem me ensinado a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais, Erivaldo e Rejane, pela dedicação e orientação em todos os momentos da minha vida.

Ao Eng^o Agr. Jean Santos, pelo amor e respeito, por estar sempre ao meu lado, sendo meu refúgio e me ajudando a superar todas as dificuldades. Sem você seria muito difícil.

A Bruna Oliveira e a Thyago Oliveira, pelo carinho e amizade.

A toda minha família, em especial ao meu tio Roberto por incentivo e apoio.

A Marília Diógenes (Lua), amiga de todas as horas, principalmente nos momentos mais difíceis. Amiga que nunca me abandonou, e mesmo quando discordava dos meus atos, nunca deixou de me apoiar.

A professora Júlia Kuklinsky Sobral por ter concedido a estirpe controle de AIA (EN303).

Aos professores da PPGCS, pelo conhecimento que me proporcionaram.

Aos colegas do laboratório do professor Mario pelos momentos compartilhados e pelas experiências enriquecidas.

A Karen Fialho, Artenisa Cerqueira, Andresa Ramos, Vinícius Gedeão, Rayssa Vincentin, André Barbosa, Alexandra Oliveira, Altanys Calheiros Vanessa Dina, Clayton Sousa e todos os outros colegas que compartilhei tristezas e alegrias durante este período.

Aos funcionários da PPGCS, em especial Maria do Socorro (Help), pela amizade e apoio.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma participaram da minha vida neste período e contribuíram para que eu conseguisse vencer este desafio.

Ao encerrar meus agradecimentos, gostaria de me desculpar pelos momentos que não pude compartilhar com aqueles que tanto amo, devido minha dedicação a este trabalho, e reforçar que mesmo quando fiquei distante, jamais deixei de amá-los.

Muito Obrigada!

*De tudo ficaram três coisas:
A certeza que estava sempre começando,
A certeza de que era preciso continuar e
A certeza que seria interrompido
antes de terminar.*

*Fazer da interrupção, um caminho novo.
Fazer da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro.*

Fernando Pessoa

OLIVEIRA, Cybelle Souza de, M.Sc., Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Julho de 2011. **DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SABIÁ NATIVOS DE UM ARGISSOLO SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS.**
Orientador: Mario de Andrade Lira Júnior. Co-orientadores: Júlia Kuklinsky Sobral e Newton Pereira Stamford.

RESUMO

O sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) é uma leguminosa forrageira arbustivo-arbórea que melhora a fertilidade do solo através da fixação biológica de nitrogênio quando associada simbioticamente a rizóbios. Estas bactérias têm grande biodiversidade e incluem várias sub-classes de proteobactérias. Diante disto, o presente trabalho objetivou caracterizar morfofisiologicamente 303 isolados obtidos de nódulos provenientes do sabiá oriundo de amostras de solos sob diferentes coberturas vegetais, a fim de observar a sua diversidade. Os isolados foram obtidos de nódulos de sabiá coletados diretamente de um Argissolo Vermelho-Amarelo da estação experimental do IPA, Itambé, PE e de nódulos de sabiá obtidos através de amostras do mesmo solo sob Mata Nativa, Bosque de sabiá, e pastagens de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*. Os isolados foram caracterizados cultural e fisiologicamente (solubilização de fosfato de cálcio, tolerância a acidez e alumínio, salinidade, antibióticos e herbicidas). A caracterização cultural mostra uma grande diversidade morfológica entre eles. A maioria dos isolados apresentou baixa ou nenhuma capacidade de solubilizar fosfato, não relacionada com a acidificação do meio de cultura, e elevada resistência à acidez e alumínio, salinidade, e aos

antibióticos ampicilina, cefotaxima, gentamicina, vancomicina e ao herbicida 2,4-D, e de sensibilidade aos antibióticos ciprofloxacina, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico, rifampicina, tetraciclina, e aos herbicidas paraquat e round-up. Não houve ligação entre produção de muco e resistência a estes estresses ambientais. Os índices de diversidade e uniformidade demonstraram elevada diversidade e dominância, e o agrupamento dos isolados confirmou a grande diversidade. Assim a população de rizóbios apresenta elevada diversidade, a produção de ácidos orgânicos não é o principal mecanismo de solubilização do fosfato de cálcio e a produção de muco não está ligada a resistência bacteriana aos estresses ambientais *in vitro*.

OLIVEIRA, Cybelle Souza de, M.Sc., Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Julho de 2011. **PHENOTYPIC DIVERSITY OF “SABIÁ” RHIZOBIAL ISOLATES
NATIVE FROM NA ARGISOIL UNDER DIFFERENT VEGETATION COVERS.**
Orientador: Mario de Andrade Lira Júnior. Co-orientadores: Júlia Kuklinsky Sobral e
Newton Pereira Stamford.

ABSTRACT

“Sabiá” (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) is a shrub or tree forage legume which enhances soil fertility through biological nitrogen fixation when symbiotically associated to rhizobia. These bacteria have high biodiversity, including several proteobacteria subclasses. So, this work aimed to characterize morpho-physiologically 303 isolates from “sabiá” nodules obtained directly from a Red-Yellow Argis soil of the Itambé Experimental Station of IPA, and from “sabiá” nodules from soil samples of the same soil under Native Forest, “sabiá” woodlots and *Brachiaria humidicola* and *B. decumbens* pastures. The isolates were culturally and physiologically characterized (calcium phosphate solubilization, tolerance to acidity and aluminum, to salinity, to antibiotics and to herbicides). Cultural characterization presents high morphological diversity among the isolates. Most isolates had low to no phosphate solubilization capacity, unrelated to culture media acidification, and high resistance and high resistance to acidity and aluminum, and to ampicillin, cefotaxime, gentamicin, vancomycin antibiotics and to 2,4D herbicide and sensitivity to ciprofloxacin, chloramphenicol, kanamycin, nalidixic acid, rifampicin and tetracycline antibiotics and paraquat and round-up herbicides. There was no link between mucus

production and resistance to these environmental stresses. Diversity and uniformity indexes indicate high diversity and dominance, and isolate grouping confirms the high diversity. So the rhizobial population has high diversity, organic production should not be considered the main calcium phosphate solubilization mechanism and mucus production is not linked to bacterial resistance to *in vitro* environmental stresses

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Distribuição dos isolados de sabiá obtidos de diferentes coberturas vegetais quanto à capacidade de absorver corante (A.C.), diâmetro das colônias em mm (D), produção de muco (P.M.), consistência do muco (C.M.), forma, elevação e capacidade de modificar o pH do meio (pH).31
- Figura 2. Prevalência de resistência dos isolados de rizóbio de nódulos de sabiá obtidos de solo sob diferentes vegetações, aos antibióticos AMP (Ampicilina), CTX (Cefotaxima), GEN (Gentamicina) e VAN (Vancomicina).39
- Figura 3. Prevalência de sensibilidade dos isolados de rizóbio de nódulos de sabiá obtidos de solo sob diferentes vegetações, aos antibióticos CIP (Ciprofloxacina), CLO (Cloranfenicol), EST (Estreptomicina), KAN (Kanamicina), NAL (Ácido nalidíxico), RIF (Rifampicina) e TET (Tetraciclina).39
- Figura 4. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob mata nativa, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.....46
- Figura 5. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob bosque de sabiá, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.....47

Figura 6. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob *Brachiaria humidicola*, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.....48

Figura 7. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob *Brachiaria decumbens*, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.....49

Figura 8. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados obtidos de sabiá direto do campo, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.50

Figura 9. Dendrograma de similaridade de todos os isolados de sabiá, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gêneros não-tradicionais de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas.	19
Tabela 2. Características químicas das amostras de solo utilizadas para obtenção dos nódulos.	22
Tabela 3. Código de identificação dos isolados de sabiá obtidos de diferentes coberturas vegetais.	23
Tabela 4. Descritores utilizados na caracterização cultural dos isolados.	24
Tabela 5. Padrões interpretativos de diâmetro de halo de inibição utilizados em teste de disco difusão.	28
Tabela 6. Efeito da cobertura vegetal sobre a solubilização de fosfato de cálcio de isolados rizobianos de sabiá	33
Tabela 7. Distribuição dos isolados quanto à capacidade de solubilização de fosfato e modificação do pH do meio de cultura.	34
Tabela 8. Tolerância de rizóbios crescidos em meio com baixos valores de pH e com alumínio após cinco dias de incubação.	35

Tabela 9. Tolerância dos rizóbios a acidez e acidez + alumínio em relação à produção de mucilagem.	36
Tabela 10. Tolerância de rizóbios crescidos em meio com diferentes níveis de salinidade após cinco dias de incubação.	37
Tabela 11. Tolerância salina dos isolados em relação à produção de muco.	38
Tabela 12. Distribuição dos isolados de sabiá quanto à capacidade de tolerar ou não antibióticos e produzir mucilagem.	42
Tabela 13. Distribuição dos isolados, de diferentes coberturas vegetais, quanto resistência e sensibilidade aos herbicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), paraquat (PAR) e round-up (ROU).	43
Tabela 14. Relação de produção de muco e resistência ou sensibilidade dos isolados de sabiá aos herbicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), paraquat (PAR) e round-up (ROU).	44
Tabela 15. Índices de diversidade e uniformidade dos isolados de sabiá obtidos de solos sob diferentes coberturas vegetais.	52
Tabela 16. Principais características dos grupos de similaridade formados nas diferentes coberturas vegetais.	66

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	XI
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. SABIÁ	17
2.2. DIVERSIDADE BACTERIANA	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. MATERIAL DE ESTUDO	21
3.2. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL	23
3.3. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	25
3.3.1. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	25
3.3.2. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ACIDEZ + ALUMÍNIO	26
3.3.3. TOLERÂNCIA A SALINIDADE	27
3.3.4. TOLERÂNCIA A ANTIBIÓTICOS	27
3.3.5. TOLERÂNCIA A HERBICIDAS	28

3.3.6. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS.....	29
3.3.7. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL	30
4.2. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	32
4.2.1. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	32
4.2.2. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ACIDEZ + ALUMÍNIO.....	34
4.2.3. TOLERÂNCIA A SALINIDADE	36
4.2.4. TOLERÂNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	38
4.2.5. TOLERÂNCIA A HERBICIDAS	42
4.2.6. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS.....	45
4.2.7. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA	52
5. CONCLUSÕES.....	54
LITERATURA CITADA	55
APÊNDICE A	65

1. INTRODUÇÃO

O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) é uma leguminosa forrageira tropical, arbórea, de pequeno porte, que pode atingir até sete metros de altura, propagando-se via semente (VASCONCELOS et al., 1984). Esta espécie proporciona significativo aporte de nutrientes e matéria orgânica sob forma de serrapilheira, com produção de 6 a 15 Mg.ha⁻¹.ano⁻¹, vegetando em solos pobres ou férteis, como os da zona da mata pernambucana, brejos paraibanos e da baixada fluminense (COSTA, 1983; COSTA et al., 2004; SUASSUNA, 1982).

Ao associar-se simbioticamente, o sabiá terá seu suprimento total ou parcial de nitrogênio, através da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Inicialmente, acreditava-se que o principal simbiote de sabiá era bactérias do gênero *Rhizobium* (ASSIS JUNIOR et al., 1986), pertencente às α -proteobactérias. No entanto, com a descoberta de novos representantes em outras subclasses, o principal simbiote de *Mimosa* passou a ser o gênero *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2010).

Esta modificação ocorreu devido às constantes mudanças na diversidade de rizóbios, a exemplo da recente inclusão de γ -proteobactérias, como bactérias nodulíferas em leguminosas (SHIRAISHI et al., 2010). Porém, as informações a cerca da diversidade microbiana do solo ainda são incipientes, e por isso, é relevante estudar a diversidade, para que se seja aumentado o conhecimento sobre estes micro-organismos.

Diversas maneiras são utilizadas para se estudar esta diversidade, tais como as metodologias de avaliação cultural e fisiológica, que buscam obter informações relevantes da própria fisiologia, ecologia e taxonomia destes micro-organismos (FERNANDES JÚNIOR, 2009), permitindo maior esclarecimento e a

ampliação de informações sobre os rizóbios. E apesar de existir diversas limitações na caracterização cultural, esta caracterização pode ser considerada como uma boa alternativa para a análise preliminar da diversidade destas bactérias (ZILLI et al., 2003).

Diante disto, o presente trabalho objetivou caracterizar morfofisiologicamente isolados obtidos de nódulos da leguminosa forrageira sabiá de solo sob diferentes coberturas vegetais, a fim de observar sua diversidade bacteriana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SABIÁ

O sabiá é uma leguminosa nativa da caatinga do nordeste brasileiro, sendo também conhecida como sabiazeiro, angiquinho-sabiá, unha de gato e sansão do campo. É encontrada no cerrado e habita preferencialmente regiões de clima semi-árido, ocorrendo de forma natural na região nordeste e Minas Gerais (CARVALHO, 2007).

Esta espécie apresenta porte arbustivo a arbóreo, podendo atingir 10 metros de altura. Geralmente seu tronco tem acúleos em maior ou menor grau, mas pode ser inerme, com casca externamente de coloração pardo-clara e internamente branca. Sua copa é espalhada, pouco densa e muito ramificada, apresentando folhas compostas bipinadas, alternas, comumente com seis pinas opostas. Suas flores são bissexuais, brancas, pequenas e suavemente perfumadas e seu fruto é um craspédio articulado plano com sementes variando em forma, duras e lisas, e que apresentam dormência do tipo impermeabilidade do tegumento à água (CARVALHO, 2007).

Sua folhagem tem importante valor nutricional para alimentação animal, sendo recomendada como forrageira em sistemas silvipastoris (DRUMOND et al., 1999) e bastante selecionada por animais em pastejo quando sem acúleos (VIEIRA et al., 2005). Também é uma importante via de retorno de nitrogênio (N) e fósforo (P), quando depositada ao solo, contribuindo para a manutenção desse ecossistema (FREIRE et al., 2010). Além de incorporar N e P ao sistema, proporciona incremento

dos macronutrientes C (carbono), K (potássio), Ca (cálcio) e Mg (magnésio) com significativo aumento nas concentrações de C e N (COSTA et al., 1997), promovendo melhoria na qualidade da forragem em oferta (CARVALHO et al., 2000).

Fernandes et al. (2006) e Ferreira et al. (2007) observaram deposição de 177 e 156 Kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ em bosques de sabiá. No entanto, provavelmente esta quantidade de nitrogênio retornada via serrapilheira não é advinda apenas da fixação biológica de nitrogênio, mas também do nitrogênio reciclado e reabsorvido pela planta, como relatado por Freire et al. (2010).

O sabiá também proporciona melhoria à fertilidade do solo através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), o qual permite seu suprimento total ou parcial de nitrogênio. Suas raízes associam-se com bactérias dos gêneros *Rhizobium* (ASSIS JUNIOR et al., 1986) e *Burkholderia* (CHEN et al., 2008), dentre outros, no qual é estabelecida a simbiose leguminosa-rizóbio resultando a formação de um grande número de nódulos responsáveis pela FBN (DÖBEREINER, 1967).

2.2. DIVERSIDADE BACTERIANA

O grupo tradicional de rizóbios, inicialmente classificados em uma única família (Rhizobiaceae), passou por modificação e foi subdividido nas famílias Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*) e Xanthobacteriaceae (*Azorhizobium*), perfazendo um total de 57 espécies descritas até o momento (DONATE-CORREA et al., 2007), todas pertencentes à sub-classe das α -proteobactérias. Além destes, atualmente sabe-se que as leguminosas são

amplamente noduladas por β -proteobactérias (BONTEMPS et al., 2010) e até mesmo γ -proteobactéria (SHIRAISHI et al., 2010) (**tabela 1**), sendo que em *Mimosa*, os principais simbiontes são β -proteobactérias do gênero *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2010).

Tabela 1. Gêneros não-tradicionais de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas.

Sub-classe	Família	Gênero	Espécie Hospedeira	Referências
α -proteobactéria	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>Crotalaria</i> spp.	Jourand et al. (2004)
	Bradyrhizobiaceae	<i>Blastobacter</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum; Eardly (2002)
	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas et al. (2003)
	Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo et al. (2005)
	Phyllobacteriaceae	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde et al., (2005)
	Rhizobiaceae	<i>Shinella</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	Lin et al. (2008)
β -proteobactéria	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>Mimosa</i>	Moulin et al. (2001)
	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus*</i>	<i>Mimosa</i>	Chen et al. (2001) reclassificada por Vandamme; Coenye (2004)
	Burkholderiaceae	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde et al. (2003)
γ -proteobactéria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Shiraishi et al. (2010)
	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Hedysarum spinosissimum</i>	Mahdhi et al. (2011)

Esta proliferação de novos gêneros foi possibilitada pelo uso de técnicas moleculares (JESUS et al., 2005). No entanto, o uso destas técnicas é de alto custo,

e por isso, a caracterização cultural ainda é utilizada para se obter informações a respeito da fisiologia, ecologia e taxonomia rizobiana (CHAGAS JÚNIOR et al., 2010a), onde os descritores utilizados nesta caracterização são: a modificação do pH do meio de cultura, produção e consistência de exopolissacarídeos, tempo de aparecimento e morfologia das colônias (VINCENT, 1970). Com a finalidade de se obter informações complementares a respeito da ecofisiologia dos rizóbios, também é feita a caracterização fenotípica (STROSCHEIN, 2007), englobando testes de capacidade de solubilização de fosfatos (HARA; OLIVEIRA, 2005), tolerância a acidez e alumínio tóxico (HARA; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1999), salinidade (NÓBREGA et al., 2004) e resistência intrínseca a antibióticos (XAVIER et al., 1998), dentre outros.

Em estudos sobre diversidade de rizóbios, além de análise das características cultural e fenotípica, dentre outras, índices matemáticos são utilizados para mensurar esta diversidade, permitindo que ela seja avaliada de forma qualiquantitativa (JESUS et al., 2005; MELLONI et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') é um dos mais utilizado para calcular a diversidade de amostras ambientais (RICOTTA, 2004). Ele é baseado em informações acerca da riqueza e abundância relativa de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998), que admite que todos os indivíduos foram amostrados ao acaso e que todas as espécies estão representadas na amostra (MAGURRAN, 2004).

Uma derivação do índice de Shannon-Weaver é o índice de uniformidade de Pielou (J'), que mede o padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies (MOÇO et al., 2005), onde menores valores representam comunidades menos

uniformes, com dominância de um ou mais grupos (BEGON et al., 1996), sendo de grande importância a utilização destes índices em estudos sobre diversidade, pois eles fornecem informações sobre o grau de distribuição das espécies em diferentes ecossistemas (KENNEDY, 1999).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDO

Foram utilizados 303 isolados de nódulos de sabiá obtidos em etapas anteriores a este trabalho. Destes isolados, 57 foram isolados de nódulos de sabiá coletados diretamente do campo (SD) (**Tabela 3**), em um bosque de sabiá com aproximadamente 14 anos, oriundo de progenitores F4 de plantas sem acúleo, situado na Estação Experimental do IPA (07°25'S, 35°06' W e altitude de 190 m), no município de Itambé, na zona da mata de Pernambuco. Os demais isolados foram obtidos a partir de uma determinação de população de nódulos de sabiá através de experimento realizado em casa de vegetação utilizando amostras compostas homogeneizadas de Argissolo Vermelho-Amarelo da mesma Estação Experimental, sob diferentes coberturas vegetais: Mata Nativa - MN (com aproximadamente 60 anos), Bosque de Sabiá – BS (mesmo em que foram obtidos os nódulos), pastagem de *Brachiaria humidicola* – Bh (com aproximadamente 50 anos) e pastagem de *B. decumbens* – Bd (com cerca de 30 anos) (LIRA, 2011 – comunicação pessoal¹). As

¹ Lira, Mario de Andrade – Comunicação pessoal baseada na sua experiência como agrônomo da Estação Experimental no final da década de 1960 em conversa com a equipe em julho de 2011.

amostras de solo foram utilizadas para caracterização de fertilidade conforme os métodos padrão (EMBRAPA, 1999), com os resultados na **Tabela 2**.

O experimento foi realizado em bandejas plásticas com 64 células, utilizando vermiculita como substrato e sabiá como planta isca. As plântulas foram transplantadas para as células e a determinação da população rizobiana foi efetuada pelo método do número mais provável (ALEXANDER, 1965) adicionando-se 1 g de solo diluído cinco vezes, totalizando oito níveis de diluição ($0, 5^{-1}$ a 5^{-7}). Após 30 dias de inoculação foi realizada a coleta das plantas, acondicionando-se nódulos em tubos de vácuo com sílica-gel para posterior isolamento.

Tabela 2. Características químicas das amostras de solo utilizadas para obtenção dos nódulos.

Cobertura vegetal	pH	P	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Ca ²⁺	Al ³⁺	H + Al	C.O.	M.O.
	(água)	(mg.dm ⁻³)	----- cmol _c dm ⁻³ -----			----- g.kg ⁻¹ -----				
MN	5,2	3,7	0,48	0,25	6,08	4,11	0,45	5,92	41,8	72,0
BS	5,0	7,3	0,55	0,30	4,93	3,33	0,26	5,26	20,4	35,2
Bh	5,4	23,0	3,69	1,47	3,75	2,00	0,15	4,30	17,9	30,9
Bd	5,2	14,0	3,43	1,26	3,71	2,10	0,28	4,54	19,3	33,2

O isolamento seguiu o procedimento padrão, conforme sintetizado em Hungria (1994), resultando em 53, 82, 64 e 47 isolados das coberturas MN, BS, Bh e Bd, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. Código de identificação dos isolados de sabiá obtidos de diferentes coberturas vegetais.

Cobertura Vegetal	Total de isolados	Identificação	Numeração
Mata Nativa	53	UFRPEMC-MN	2; 16; 27; 74; 77; 82; 90; 129; 130; 132 – 136; 138; 139; 142; 144 – 149; 202 – 209; 246 – 257; 259; 301 – 309.
Bosque de Sabiá	82	UFRPEMC-BS	3; 5; 7; 10; 11; 18; 23; 24; 33; 47; 48; 51; 56; 59; 60; 61; 65 – 69; 72; 78; 80; 85; 93; 97; 107; 109; 112; 113; 115 – 117; 122; 151 – 164; 210; 211; 213 – 218; 220; 222 – 224; 260; 261; 263 – 270; 310 – 313; 315; 316; 318 – 321; 323; 324.
<i>Brachiaria humidicola</i>	64	UFRPEMC-Bh	6; 8; 9; 17; 43; 50; 52; 71; 73; 84; 86; 88; 92; 99; 100; 103; 104; 110; 118; 126; 127; 165 – 184; 186; 188 – 193; 195 – 201; 225; 226; 293; 294; 296 – 299; 325.
<i>Brachiaria decumbens</i>	47	UFRPEMC-Bd	26; 28; 29; 35; 40; 54; 75; 76; 98; 101; 114; 227 – 231; 233 – 245; 271 – 276; 279 – 283; 285 – 289; 291; 292.
Sabiá direto do campo	57	UFRPEMC-SD	326 – 336; 338 – 341; 343 – 356; 358 – 365; 367; 369; 370; 372; 374 – 379; 382; 383; 388; 390; 391; 393; 395; 396; 398; 400.

3.2. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL

As características culturais avaliadas foram: absorção do corante Vermelho do Congo, tempo de crescimento; diâmetro, forma, elevação, borda, transparência, superfície e coloração da colônia; consistência, produção de muco e modificação do pH do meio de cultura (**tabela 4**) (JESUS et al., 2005).

Tabela 4. Descritores utilizados na caracterização cultural dos isolados.

Características culturais	Faixa de observação
Absorção de corante	Sim Não
Tempo de crescimento	≤ 3 dias > 3 dias
Diâmetro da colônia	≤ 2 mm > 2 mm
Forma	Circular Puntiforme Irregular
Cor	Incolor Branca Bege Amarela Rosa
Elevação	Plana Lente Convexa Umbilicada Umbanada Drop-like Inteira
Borda	Ondulada Lobada Denteada Filamentosa
Transparência	Transparente Semi-translúcida Opaca
Superfície	Rugosa Lisa Papilosa
Consistência do muco	Seca Aquosa Gomosa Viscosa Butírica
Produção de muco	Escasso Pouco Moderado Abundante
Modificação do pH	Ácido Neutro Alcalino

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata utilizando um isolado por placa de Petri com meio YMA com azul de bromotimol, com exceção para análise de absorção de corante Vermelho do Congo. A repicagem foi realizada com alça de Platina, sendo utilizado o método de semeadura por esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Todas as placas foram envolvidas com filme plástico PVC e incubadas a 28°C por 7 dias.

Para verificação da modificação do pH do meio os isolados foram multiplicados em 25 mL de meio YM com azul de bromotimol e pH 6,8 em frascos de penicilina de 50 mL e mantidos sob agitação de 120 rpm por 48h. A mudança de coloração do meio para amarelo indicou a formação de ácido, para a cor azul indicou a formação de álcalis e a permanência em verde indicou que não houve mudança no pH.

3.3. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

3.3.1. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Foram utilizadas placas de Petri com meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) modificado pelo uso de fosfato bicálcico (10 g de glicose; 8,95g de CaHPO_4 ; 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2g de KCl; 0,1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15g de ágar). Para a multiplicação procedeu-se da mesma forma descrita anteriormente. Após o crescimento bacteriano, procedeu-se a inoculação de quatro isolados por placa de Petri usando o método da gota (ALIKHANI et al., 2006). As placas foram envolvidas por filme plástico de PVC e mantida em estufa de crescimento bacteriológico a 28°C.

Após 15 dias foram realizadas as medições dos diâmetros (em mm) do halo de solubilização e da colônia, utilizando-se paquímetro. A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização (IS), usando a fórmula:

$$IS = \frac{\phi_{halo}}{\phi_{colônia}}$$

Com base nesses índices, as bactérias foram classificadas como estirpes com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 3$) e alta solubilização ($IS > 3$) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

3.3.2. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ACIDEZ + ALUMÍNIO

A avaliação da resistência dos rizóbios a acidez foi realizada em meio YMA com pH 4,5 ou pH 5,5. Para avaliação de resistência a acidez e alumínio foi utilizado $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, como fonte de alumínio, mantendo-se uma concentração final de $0,5 \text{ cmol}_c \text{ Al.L}^{-1}$ e o pH do meio foi corrigido para 4,5.

Foram preparados inóculos de forma similar à descrita, com inoculação em duplicatas de 20 isolados por placa da mesma forma que para a solubilização de fosfato, e com as mesmas condições de crescimento já descritas.

A avaliação foi realizada 5 dias após inoculação, considerando-se tolerante quando as colônias apresentaram desenvolvimento, e sensível em caso contrário, utilizando-se o crescimento no meio não modificado como referência visual.

3.3.3. TOLERÂNCIA A SALINIDADE

O teste de tolerância dos rizóbios a estresse salino foi realizado utilizando meio YMA com 15, 30 e 45 g.L⁻¹ de NaCl, e o meio não modificado foi utilizado como controle. A inoculação e crescimento dos isolados foram realizados de forma idêntica à empregada para avaliação de tolerância à acidez. A avaliação foi realizada 5 dias após inoculação. A classificação também procedeu como descrita em tolerância à acidez.

3.3.4. TOLERÂNCIA A ANTIBIÓTICOS

A análise de resistência a antibióticos foi realizada de acordo com o procedimento de disco difusão em ágar descrito por Bauer et al. (1966), em que o produto se difunde na superfície do ágar a partir de um disco impregnado. O procedimento foi realizado sem repetição, onde foram usados os seguintes produtos, com as respectivas doses: Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Rifampicina (30 µg), Tetraciclina (30 µg) e Vancomicina (30 µg). Todos os discos foram obtidos da SENSIFAR[®], com exceção os de Kanamicina que foi da CECON[®].

A multiplicação dos isolados seguiu o mesmo padrão anterior. A inoculação foi realizada em placas com YMA, pela imersão de algodão estéril no caldo bacteriano, seguida por escorrimento do excesso e esfregaço em toda a superfície do meio. Após, foram adicionados os quatro discos de antibióticos por

placa. Discos de papel sem antibióticos (CECON) foram utilizados como controle. O crescimento foi efetuado nas mesmas condições das demais avaliações.

Os isolados foram classificados como resistentes e sensíveis, através de avaliação visual da formação de halos sem crescimento bacteriano conforme **tabela 5** (NCCLS/CLSI, 2005).

Tabela 5. Padrões interpretativos de diâmetro de halo de inibição utilizados em teste de disco difusão.

Antibióticos	Símbolo	Concentração	Zona de inibição em mm*	
			Resistente	Sensível
Ampicilina	AMP	10 µg	13 ou menos	14 ou mais
Cefotaxima	CTX	30 µg	14 ou menos	15 ou mais
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	15 ou menos	16 ou mais
Cloranfenicol	CLO	30 µg	12 ou menos	13 ou mais
Estreptomicina	EST	10 µg	11 ou menos	12 ou mais
Gentamicina	GEN	10 µg	12 ou menos	13 ou mais
Kanamicina	KAN	30 µg	13 ou menos	14 ou mais
Nalidíxico, ácido	NAL	30 µg	13 ou menos	14 ou mais
Rifampicina	RIF	30 µg	11 ou menos	12 ou mais
Tetraciclina	TET	30 µg	14 ou menos	15 ou mais
Vancomicina	VAN	30 µg	14 ou menos	15 ou mais

* Adaptado do NCCLS/CLSI, 15º Suplemento Informativo (2005).

3.3.5. TOLERÂNCIA A HERBICIDAS

Esta avaliação foi realizada utilizando-se a mesma metodologia empregada para avaliação de resistência dos rizóbios a antibióticos, também sem repetição, utilizando discos de papel (Cecon®) impregnados com os produtos comerciais Glifosato (Round-up®), Paraquat e 2,4-D, após terem sido filtrados com

filtro de seringa com membrana 0.22 µm (modelo 99722 Techno Plast Products AG).

Foram utilizados quatro discos por placa, sendo os três herbicidas e o controle.

Foram considerados resistentes os isolados que apresentarem halo de inibição menor ou igual a 10 mm e sensíveis os demais.

3.3.6. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS

A partir das características morfofisiológicas dos isolados, para cada cobertura vegetal, foi constituída uma matriz binária (presença e ausência da característica) utilizada para a análise de *clustering* através do método Paired Group usando o índice de distâncias de Jaccard (WOLDA, 1981), calculado através do software PAST®.

Foi escolhido o nível de 60% de similaridade para observar a formação de grandes grupos, como descrito por Melloni et al. (2006).

3.3.7. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA

A diversidade para as diferentes coberturas vegetais foi avaliada pelo Índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') (SHANNON; WEAVER, 1949). Tal índice compreende a seguinte expressão:

$$H' = -\sum (P_i \ln[P_i])$$

Onde: $P_i = n_i/n$

n_i = número de isolados de cada grupo

n = número total de isolados

Quanto maior o valor deste índice, maior a diversidade entre os grupos, havendo menor dominância de alguns grupos em detrimento de outros (BEGON et al., 1996).

A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de Uniformidade de Pielou, J' , (PIELOU, 1959), que é um índice de equitabilidade derivado do índice de diversidade de Shannon-Weaver que indica se há o domínio de uma população na comunidade amostrada. Seu valor apresenta uma amplitude de 0 (uniformidade mínima) a 1 (uniformidade máxima), e é calculado pela seguinte equação:

$$J' = H / [\ln S]$$

onde:

S = número de grupos detectados

H = índice de Shannon-Weaver

Os índices de Shannon-Weaver e Pielou foram calculados através do software PAST[®] (HAMMER et al., 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL

A caracterização cultural dos 303 isolados (**Apêndice A**) indica que as características mais freqüentes foram: coloração bege, borda inteira, transparência

semi-translúcida e superfície lisa, ao passo que consistências seca e aquosa, e coloração incolor e rósea não foram observadas ao todo.

Com respeito às demais características (**figura 1**), os isolados obtidos de diferentes coberturas vegetais apresentam características distintas, havendo prevalência nos descritores pouca produção de muco, consistência de muco do tipo gomosa.

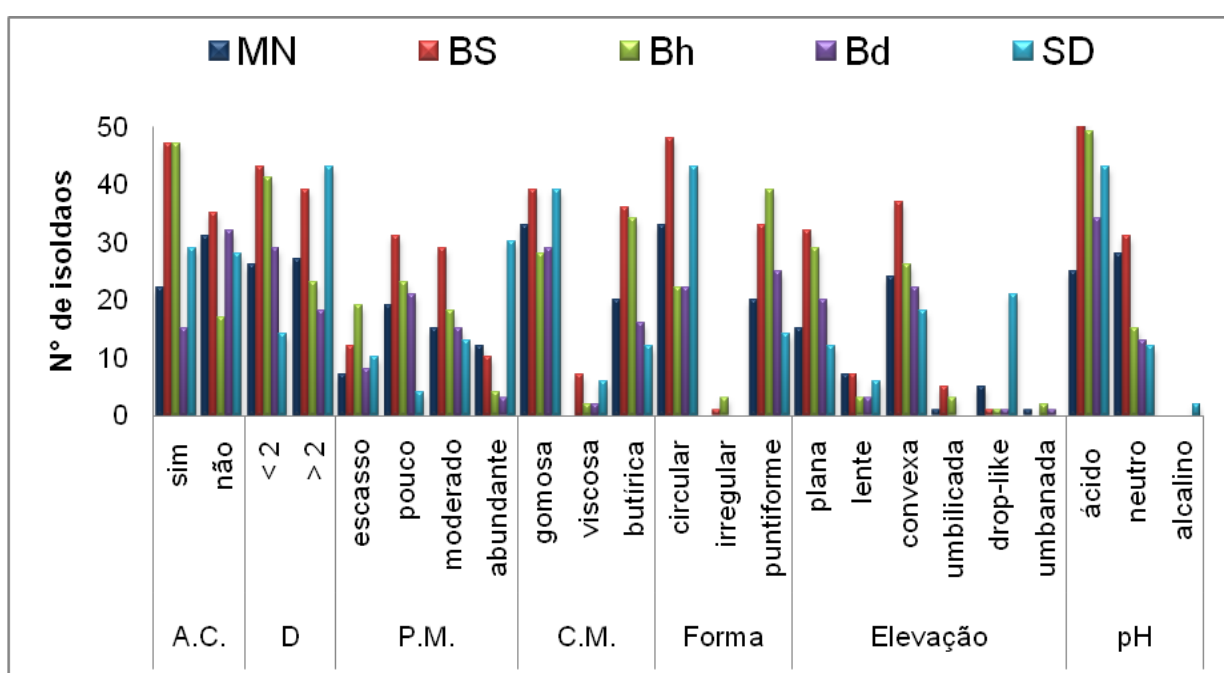


Figura 1. Distribuição dos isolados de sabiá obtidos de diferentes coberturas vegetais quanto à capacidade de absorver corante (A.C.), diâmetro das colônias em mm (D), produção de muco (P.M.), consistência do muco (C.M.), forma, elevação e capacidade de modificar o pH do meio (pH).

Com relação à capacidade de absorver vermelho do congo, a maioria dos isolados das coberturas BS, Bh e SD apresentaram tal capacidade, ao passo que nos isolados da cobertura MN e Bd prevaleceu não absorção. Quanto ao diâmetro das colônias, a maioria dos isolados das coberturas BS, Bh e Bd apresentaram

colônias $\leq 2\text{mm}$, ocorrendo o inverso com os isolados das coberturas MN e SD. Colônias circular prevaleceu nos isolados das coberturas MN, BS e SD, e puntiforme em Bh e Bd. Elevação convexa foi observada na maioria dos isolados das coberturas MN, BS e Bd. E a capacidade de produzir ácido prevaleceu nos isolados das coberturas BS, Bh, Bd e SD, havendo apenas 2 isolados produtores de álcalis.

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, com aparecimento entre 1 e 2 dias, sendo esta característica, normalmente, uma estratégia de sobrevivência (SPRENT, 1994; VAN GESTEL et al., 1991). Esta dominância por isolados de crescimento rápido também foi encontrada por Silva et al. (2007), ao caracterizarem isolados de rizóbios de feijão caupi de amostras de Argissolo Vermelho Amarelo da região semi árida de Pernambuco, indicando que se trata possivelmente de adaptação à uma fase seca, que também ocorre em menor intensidade na zona da mata norte pernambucana .

A vasta maioria das estirpes (66,7%) acidificou o meio de cultura, concordando com a literatura que relata que estirpes de crescimento rápido comumente são acidificantes (CHAGAS JÚNIOR et al., 2010b; WANG et al., 2006).

4.2. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

4.2.1. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Identificou-se maior frequência de isolados com baixa (47%) ou nenhuma capacidade de solubilizar fosfato de cálcio (43%). A média solubilização foi verificada em 10% dos isolados e apenas um isolado da cobertura SD apresentou

alta capacidade de solubilização (UFRPEMC-SD 382) (**tabela 6**), havendo, proporcionalmente, mais isolados na cobertura Bh e Bd, sem nenhuma e baixa capacidade de solubilizar fosfato, respectivamente.

Tabela 6. Efeito da cobertura vegetal sobre a solubilização de fosfato de cálcio de isolados rizobianos de sabiá

IS ¹	Cobertura Vegetal					P ≥ χ^2
	Mata Nativa	Bosque de Sabiá	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>	Sabiá direto do campo	
Não	10	36	43	10	32	1,64 × 10 ⁻⁷
Baixa	36	35	16	36	20	
Média	7	11	5	1	4	
Alta	0	0	0	0	1	

¹ IS = Índice de Solubilização (Não = não solubilizou; Baixa = IS < 2; Média = 2 < IS < 3; Alta = IS > 3)

Uma maior freqüência de bactérias com nenhuma ou baixa capacidade solubilizar fosfato de cálcio também foi encontrada por Chagas Júnior et al. (2010b), ao estudar rizóbios da Amazônia.

De modo geral, a literatura (HARA; OLIVEIRA, 2004, 2005; ILMER et al., 1995; MIKANOVÁ; NOVÁKOVÁ, 2002; SILVA FILHO et al., 2002; VASSILEV et al., 2006) relata que a capacidade presente nas bactérias do solo de solubilizar fosfato de cálcio está correlacionada com a diminuição do pH do meio através da produção de ácidos orgânicos.

Porém, 79 isolados solubilizadores de fosfato não modificaram o pH do meio de cultura, inferindo que a produção de ácidos não é um fator determinante à solubilização de fosfato, pelo menos nestes casos, com significativamente menor proporção de solubilizadores encontrados entre os isolados acidificantes (**Tabela 7**) do que entre os que não modificaram o pH do meio.

Tabela 7. Distribuição dos isolados quanto à capacidade de solubilização de fosfato e modificação do pH do meio de cultura.

IS ¹	Modificação do pH			P ≥ χ^2
	Ácido	Neutro	Alcalino	
Não	109	20	2	3,96 x 10 ⁻⁶
Baixa	75	68	0	
Média	17	11	0	
Alta	1	0	0	

¹ IS = Índice de Solubilização (Não = não solubilizou; Baixa = IS < 2; Média = 2 < IS < 3; Alta = IS > 3)

Sousa (2010) trabalhando com bactérias endofíticas de cana-de-açúcar, também encontrou falta de ligação entre produção de ácidos e solubilização de fosfato, em um trabalho com meio líquido e determinação quantitativa de pH e fósforo solubilizado. No entanto, o autor ressalta que algumas estirpes solubilizadoras de fosfato diminuíram inicial o pH do meio seguida por aumento posterior. E Chagas Júnior et al. (2010b), em estudo com isolados solubilizadores de fosfato de solos da Amazônia, relatam que a produção de ácidos orgânicos não é o único mecanismo envolvido no processo de solubilização de fosfato.

4.2.2. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ACIDEZ + ALUMÍNIO

Embora 97% dos isolados tenham apresentado tolerância a pH 5,5, 95% a pH 4,5 e 90% a acidez e alumínio, foram encontradas diferenças significativas entre as coberturas vegetais, com maior sensibilidade nos isolados obtidos das coberturas MN e Bh (**Tabela 8**). Os resultados concordam com a afirmativa de Martins (2010) e Sá (2001) de que a resistência a acidez é essencial para a resistência ao alumínio, visto que todos os isolados que foram resistentes a acidez + Al, também foram resistentes a acidez.

Tabela 8. Tolerância de rizóbios crescidos em meio com baixos valores de pH e com alumínio após cinco dias de incubação.

Níveis de Acidez		Cobertura Vegetal					P ≥ χ^2
		Mata Nativa	Bosque de Sabiá	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>	Sabiá direto do campo	
5,5	T	49	81	61	47	57	0,050323
	S	4	1	3	0	0	
4,5	T	49	79	56	46	57	0,019255
	S	4	3	8	1	0	
4,5+Al	T	48	73	52	46	55	0,018523
	S	5	9	12	1	2	

T = tolerante; S = sensível

Uma possível explicação para a elevada tolerância observada é o fenômeno “acid habituation” ou “adaptive tolerance response” (DILWORTH et al., 1999), já que os isolados são oriundos de solos com pH ácido e presença de alumínio (**tabela 2**).

Resultados semelhantes para tolerância a acidez foram encontrados por Appunu e Dhar (2006), que observaram que todas as estirpes de *Bradyrhizobium* de soja apresentaram tolerância a até pH 4,0. Enquanto Rejili et al. (2009) estudando diversidade rizobiana para *Lotus* em solos da Tunísia, observaram que 94% dos isolados de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* foram tolerantes a pH 5,5, bem como Chagas Júnior et al. (2010a) estudando rizóbios de caupi em solos da Amazônia, que encontraram 87% de bactérias tolerantes a pH 4,5 + 2 cmol_c de Al.L⁻¹.

Em contraste, Martins (2010) encontrou apenas 31% dos isolados rizobianos para *Lotus* resistentes a pH 4,2 + 50 µmol de Al.L⁻¹ (1,7 x 10⁻³ cmol_c de Al.L⁻¹) no Rio Grande do Sul, enquanto Vargas et al. (2007), também no Rio Grande do Sul, observaram que 50 µmol.L⁻¹ de Al não afetaram o crescimento de rizóbios de

acácia-negra, mas a redução do pH de 5,5 para 4,5 reduziu o crescimento de todos os isolados.

Barberi et al. (2004) relatam que uma maior produção de exopolissacarídeos confere em maior resistência à acidez e alumínio. No entanto, mais de 90% dos isolados deste trabalho com escassa ou pouco produção de muco apresentaram resistência a acidez e acidez + Al, não tendo ocorrido diferença significativa nos graus de resistência à acidez em função da produção de exopolissacarídeos (**Tabela 9**).

Tabela 9. Tolerância dos rizóbios a acidez e acidez + alumínio em relação à produção de mucilagem.

Níveis de Acidez		Produção de muco				P \geq χ^2
		Escasso	Pouco	Moderado	Abundante	
5,5	T	56	94	86	59	0,168147
	S	0	4	4	0	
4,5	T	52	94	84	57	0,696804
	S	4	4	6	2	
4,5+Al	T	48	91	80	55	0,409915
	S	8	7	10	4	

T = tolerante; S = sensível

4.2.3. TOLERÂNCIA A SALINIDADE

Todos os isolados apresentaram tolerância a 15 g.L⁻¹ de NaCl, enquanto 76 e 66% dos isolados toleraram 30 e 45 g.L⁻¹ de sal, respectivamente, com diferenças significativas na proporção de tolerância entre as coberturas vegetais (**Tabela 10**). Diferentemente do ocorrido para acidez e alumínio, não podemos considerar a adaptação dos isolados às condições do solo, já que o mesmo não apresenta qualquer problema de salinidade.

Tabela 10. Tolerância de rizóbios crescidos em meio com diferentes níveis de salinidade após cinco dias de incubação.

Níveis de NaCl (g.L ⁻¹)		Cobertura Vegetal					P ≥ χ^2
		Mata Nativa	Bosque de Sabiá	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>	Sabiá direto do campo	
15	T	53	82	64	47	57	-
	S	0	0	0	0	0	
30	T	35	59	59	30	47	0,001299
	S	18	23	5	17	10	
45	T	33	57	54	27	28	0,000759
	S	20	25	10	20	29	

T = tolerante; S = sensível

A literatura é bem diversificada quanto a informações sobre as diferentes capacidades de bactérias diazotróficas em tolerar salinidade, com faixas de tolerância das estirpes variando de 0 a 80 g/L de NaCl (FARELEIRA et al., 2007), mas de modo geral são encontrados estirpes tolerando, no máximo, 30 g/L de cloreto de sódio (NÓBREGA et al., 2004; THRALL et al., 2009; XAVIER et al., 2007).

Elsheikh (1998) relata que espécies de rizóbio de crescimento rápido, geralmente, são mais tolerantes a altas concentrações salinas em meio de cultura, pois produzem mais muco, proporcionando maior resistência da célula bacteriana ao efeito osmótico. Porém, os resultados obtidos não concordam com o autor em relação à produção de exopolissacarídeos, pois 79% e 64% dos isolados com escassa e pouca produção de muco, respectivamente, foram tolerantes a 45 g.L⁻¹ de salinidade (**tabela 11**), não havendo diferença significativa na proporção de isolados resistentes em função da produção de muco, enquanto o efeito significativo observado para 30 g.L⁻¹ decorre de maior proporção de estirpes tolerantes com escassa ou pouca produção de muco, do que com moderada ou abundante.

Tabela 11. Tolerância salina dos isolados em relação à produção de muco.

Níveis de NaCl (g.L ⁻¹)		Produção de muco				P ≥ χ^2
		Escasso	Pouco	Moderado	Abundante	
15	T	56	98	90	59	-
	S	0	0	0	0	
30	T	50	68	64	48	0,019902
	S	6	30	26	11	
45	T	44	63	54	38	0,136061
	S	12	35	36	21	

T = tolerante; S = sensível

4.2.4. TOLERÂNCIA A ANTIBIÓTICOS

Foi encontrada resistência para todos os antibióticos em 13% dos isolados, enquanto que 8% foram sensíveis a todos.

O antibiograma demonstrou que os resultados foram bastante diversificados. As proporções de resistência (**figura 2**) mais elevadas foram verificadas para AMP, CTX, GEN e VAN (71%, 71%, 70% e 54% dos isolados, respectivamente), enquanto que a maior proporção de isolados sensíveis (**figura 3**) foi observada para CIP, CLO, EST, KAN, NAL, RIF e TET (65%, 60%, 62%, 65%, 61%, 83% e 64%, respectivamente).

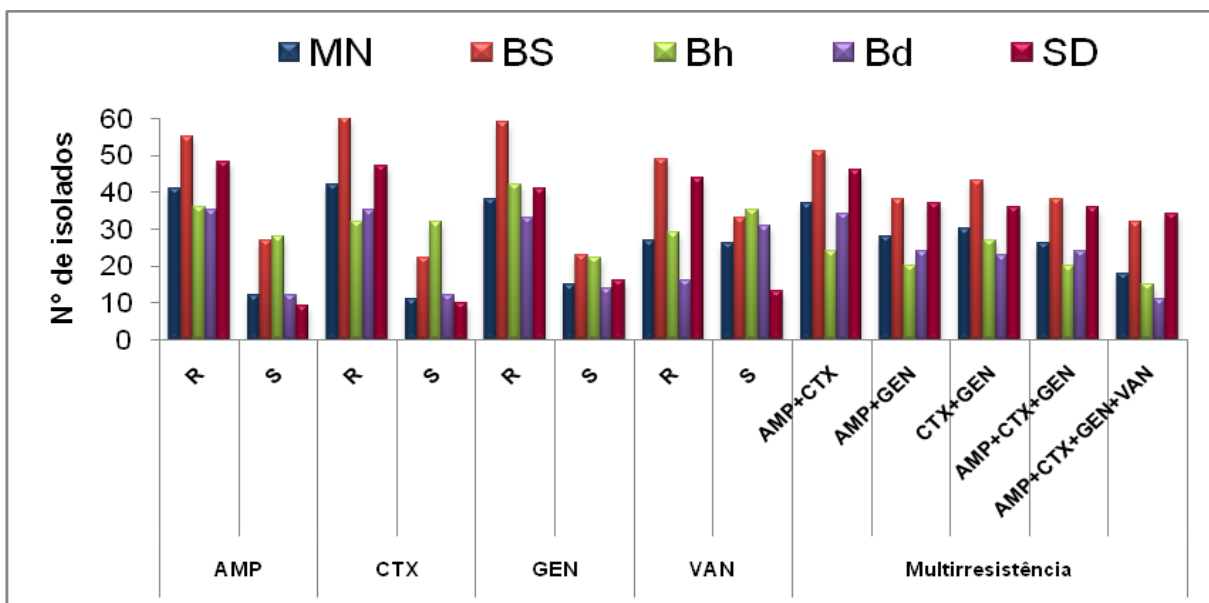


Figura 2. Prevalência de resistência dos isolados de rizóbio de nódulos de sabiá obtidos de solo sob diferentes vegetações, aos antibióticos AMP (Ampicilina), CTX (Cefotaxima), GEN (Gentamicina) e VAN (Vancomicina).

▪ R = Resistente; S = Sensível.

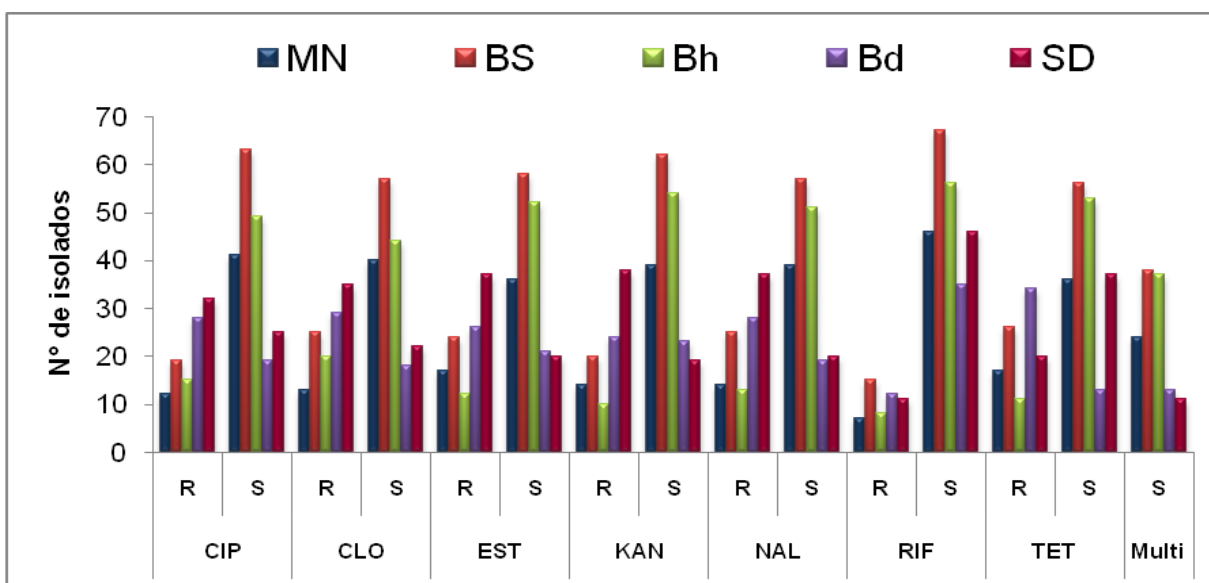


Figura 3. Prevalência de sensibilidade dos isolados de rizóbio de nódulos de sabiá obtidos de solo sob diferentes vegetações, aos antibióticos CIP (Ciprofloxacina), CLO (Cloranfenicol), EST (Estreptomicina), KAN (Kanamicina), NAL (Ácido nalidíxico), RIF (Rifampicina) e TET (Tetraciclina).

▪ R = Resistente; S = Sensível.

Dos 303 isolados, 63% apresentaram multirresistência à AMP e CTX, 49% à AMP e GEN, 52% à CTX e GEN, 48% à AMP, CTX e GEN, 36% à AMP, CTX, GEN e VAN, e 41% apresentaram multissensibilidade aos demais antibióticos.

Em relação às coberturas vegetais, houve semelhança nas prevalências de isolados resistentes e sensíveis nas amostras de MN, BS e Bh, observando-se maior resistência a AMP, CTX, GEN e VAN, exceto para cobertura Bh, e maior sensibilidade a CIP, CLO, EST, KAN, NAL, RIF e TET.

A semelhança nos resultados também ocorreu com os isolados das coberturas Bd e SD, sucedendo maior número de isolados resistentes a AMP, CIP, CLO, CTX, EST, GEN, KAN e NAL, e sensíveis a RIF, diferenciando-se nos resultados de TET e VAN.

A literatura concorda com os resultados para AMP, onde a alta resistência também foi observada por Fernandes & Fernandes (2000), ao verificar que 67% dos isolados de rizóbios nativos de tabuleiros costeiros foram resistentes a AMP; por Raza et al. (2001), encontrando 70% de resistência em rizóbios para *Lupinus albus*; por Hosney et al. (2006), observando 74% de resistência em *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*; e por Florentino et al. (2010) ao encontrar 90% de resistência em estirpes de *Bradyrhizobium*.

Em relação à GEN e VAN, a elevada resistência também foi observada por Cuadrado et al., (2009), caracterizando estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* de feijão caupi, encontraram 77% das linhagens resistentes a GEN; por Hosney et al. (2006) encontrando resistência à GEN e VAN de 67% e 79% das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; e por Florentino et al. (2010) observando 90% das estirpes

de *Bradyrhizobium* resistindo a GEN e VAN. Os dois últimos autores também observaram multirresistência a AMP, GEN e VAN.

Esta elevada tolerância dos isolados a antibióticos pode ser decorrente de um possível antagonismo a outros organismos do solo, como relatado por Florentino et al. (2010).

No que se diz respeito à sensibilidade a antibióticos observada pelos isolados, esta também foi relatada por Teaumroong et al. (1995) em estudo com estirpes de *Bradyrhizobium*, ao encontrar a maioria das estirpes sensíveis a CLO, EST, NAL e TET, enquanto que Hosney et al. (2006) trabalhando com estirpes de *Rhizobium*, observaram que a maioria das estirpes foram sensíveis a CLO, EST, KAN, NAL, RIF e TET.

Em relação às resistências encontradas nos isolados da cobertura Bd e SD, presumidamente, estas foram adquiridas através da contaminação do solo por meio de excrementos de animais tratados com antibióticos, visto que foi localizado o elevado número de isolados resistentes. Desta forma, este episódio pode ser eventualmente explicado pela ocorrência e estabilidade dos antibióticos nestas áreas, que contribuiu no aparecimento de bactérias resistentes.

A presença de organismos produtores de antibióticos ou existência natural de um reservatório de genes resistentes também pode ter desencadeado tal ocorrência, conforme Esiobu et al. (2002) e Schmitt et al. (2006), respectivamente.

Kumar et al. (2007) e Sinclair e Eaglesham (1984), relatam que a resistência a antibióticos está diretamente relacionada com a produção de muco. No entanto, como observado para todas outras tolerâncias estudadas, não foi observado este tipo de analogia (**tabela 12**), visto que apenas para AMP, CTX, RIF,

TET e VAN foram encontrados diferenças significativas na proporção de resistência em função da produção de muco, com maior proporção de estirpes sensíveis entre as com maior produção de muco.

Tabela 12. Distribuição dos isolados de sabiá quanto à capacidade de tolerar ou não antibióticos e produzir mucilagem.

Antibióticos		Produção de muco				P \geq χ^2
		Escasso	Pouco	Moderado	Abundante	
AMP	R	33	69	48	45	0,0134481
	S	23	29	42	14	
CIP	R	9	28	21	15	0,3719193
	S	47	70	69	44	
CLO	R	8	29	19	17	0,1259444
	S	48	69	71	42	
CTX	R	32	72	52	47	0,0071971
	S	24	26	38	12	
EST	R	10	29	21	19	0,2517502
	S	46	69	69	40	
GEN	R	3	19	16	8	0,1051909
	S	53	79	74	51	
KAN	R	4	20	16	12	0,162976
	S	52	78	74	47	
NAL	R	16	39	29	22	0,4844683
	S	40	59	61	37	
RIF	R	4	24	19	4	0,0040363
	S	52	74	71	55	
TET	R	13	45	29	9	0,0003638
	S	43	53	61	50	
VAN	R	20	42	39	39	0,0055428
	S	36	56	51	20	

R = resistente; S = sensível

4.2.5. TOLERÂNCIA A HERBICIDAS

Diferentemente do ocorrido para os antibióticos, apenas 7% apresentaram multirresistência, ao passo que 42% (128 isolados) foram multissensíveis.

O único herbicida que apresentou prevalência de resistência entre os isolados foi o 2,4-D, ocorrendo em 32 isolados da cobertura MN, 49 de BS e 29 de Bd, com diferença significativa para as demais coberturas. A proporção de isolados resistentes e sensíveis para este herbicida foi semelhante, e 90% dos isolados que foram sensíveis ao 2,4-D também foram sensíveis aos outros dois herbicidas.

Houve prevalência de sensibilidade a Paraquat e Round-up em todas coberturas vegetais, onde a proporção de bactérias sensíveis em relação às resistentes foi de 1,6 a 15 vezes maior (**tabela 13**), havendo diferença significativa entre as coberturas vegetais para 2,4-D e Round-up.

Tabela 13. Distribuição dos isolados, de diferentes coberturas vegetais, quanto resistência e sensibilidade aos herbicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), paraquat (PAR) e round-up (ROU).

Herbicidas		Cobertura Vegetal					P ≥ χ^2
		Mata Nativa	Bosque de Sabiá	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>	Sabiá direto do campo	
2,4 – D	R	32	49	27	29	24	0,04375
	S	21	33	37	18	33	
PAR	R	4	7	4	18	18	2,04E-07
	S	49	75	60	29	39	
ROU	R	8	7	9	10	16	0,033602
	S	45	75	55	37	41	
Todos	R	4	5	2	4	7	0,411614
	S	20	33	33	15	27	

R = resistente; S = sensível

Esta prevalência de resistência pode estar associada à capacidade de estirpes de rizóbios em degradar 2,4-D, como observado por Itoh et al. (2004) que ao estudar a degradação de 2,4-D em uma mata nativa observaram que estirpes de *Sphingomonas* sp. e *Bradyrhizobium* sp. estavam envolvidas no processo.

De modo geral, os herbicidas impactaram sobre o crescimento dos isolados. Jaques et al. (2010) e Santos et al., 2004, estudando estirpes de *Bradyrhizobium* relataram que o glifosato é capaz inibir o crescimento bacteriano, como observado neste estudo. O mesmo ocorre com o paraquat, como ressaltado por Santos et al. (2006), ao estudarem o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*.

Quanto à análise de resistência a herbicidas, em comparação com a quantidade de muco produzido pelos isolados, a grande maioria que produziu muco em quantidade moderada a abundante apresentou sensibilidade a Paraquat, Round-up e multissensibilidade, discordando de Kumar et al. (2007) que consideram que a proteção da célula bacteriana a compostos tóxicos está ligada a produção de exopolissacarídeos. Enquanto para 2,4-D houve ligação entre maior resistência e produção de muco, concordando com os autores (**Tabela 14**),

Tabela 14. Relação de produção de muco e resistência ou sensibilidade dos isolados de sabiá aos herbicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), paraquat (PAR) e round-up (ROU).

Herbicidas		Produção de exopolissacarídeos				P \geq χ^2
		Escasso	Pouco	Moderado	Abundante	
2,4 – D	R	22	59	45	33	0,08004
	S	34	39	45	26	
PAR	R	6	22	12	11	0,200871
	S	50	76	78	48	
ROU	R	7	19	17	9	0,67365
	S	49	79	73	50	
Todos	R	2	10	5	5	0,221295
	S	30	35	39	24	

4.2.6. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS

No agrupamento dos isolados de cada cobertura vegetal foi observado que apenas 2 isolados ambos oriundos da cobertura Bd apresentaram 100% de similaridade, no entanto, quando feita a comparação de todos isolados, independente da cobertura vegetal, observou-se a formação de mais três grupos com dois isolados cada, demonstrando haver isolados com a mesma característica morfofisiológica em cobertura vegetal distinta.

Nos dendrogramas, a partir do ponto de corte de 60% de similaridade, foram observados a formação de 18 grupos na cobertura MN, com menor similaridade entre os isolados de 36% (**figura 4**), 21 em BS, com 32% de menor similaridade (**figura 5**), 17 em Bh, com menor similaridade de 43% (**figura 6**), 11 em Bd, com 30% de menor similaridade (**figura 7**), apenas nove em SD, com menor similaridade de 40% (**figura 8**), e 47 grupos com 28% de menor similaridade, quando todos isolados foram analisados conjuntamente, havendo maior variabilidade entre os isolados, na análise conjunta (**figura 9**). As principais características dos grupos das coberturas vegetais e o número de isolados classificados por grupo estão descritos no Apêndice A.

A caracterização cultural e fisiológica promoveu grande diferenciação dos isolados. Ao realiza este tipo de análise, Chagas Júnior et al. (2010a) conseguiram agrupar isolados de rizóbios nativos de solos da Amazônia em *Bradyrhizobium elkanni*, *Sinorhizobium fredii* e três espécies de *Rhizobium*, e Jesus et al. (2005), utilizando apenas a caracterização cultural conseguiram alocar isolados de sitrato em diferentes espécies de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, demonstrando, desta forma, que a caracterização cultural e fisiológica é um recurso

que ainda deve ser utilizado em estudo de diversidade bacteriana, em que pese a importância crescente das avaliações genômicas.

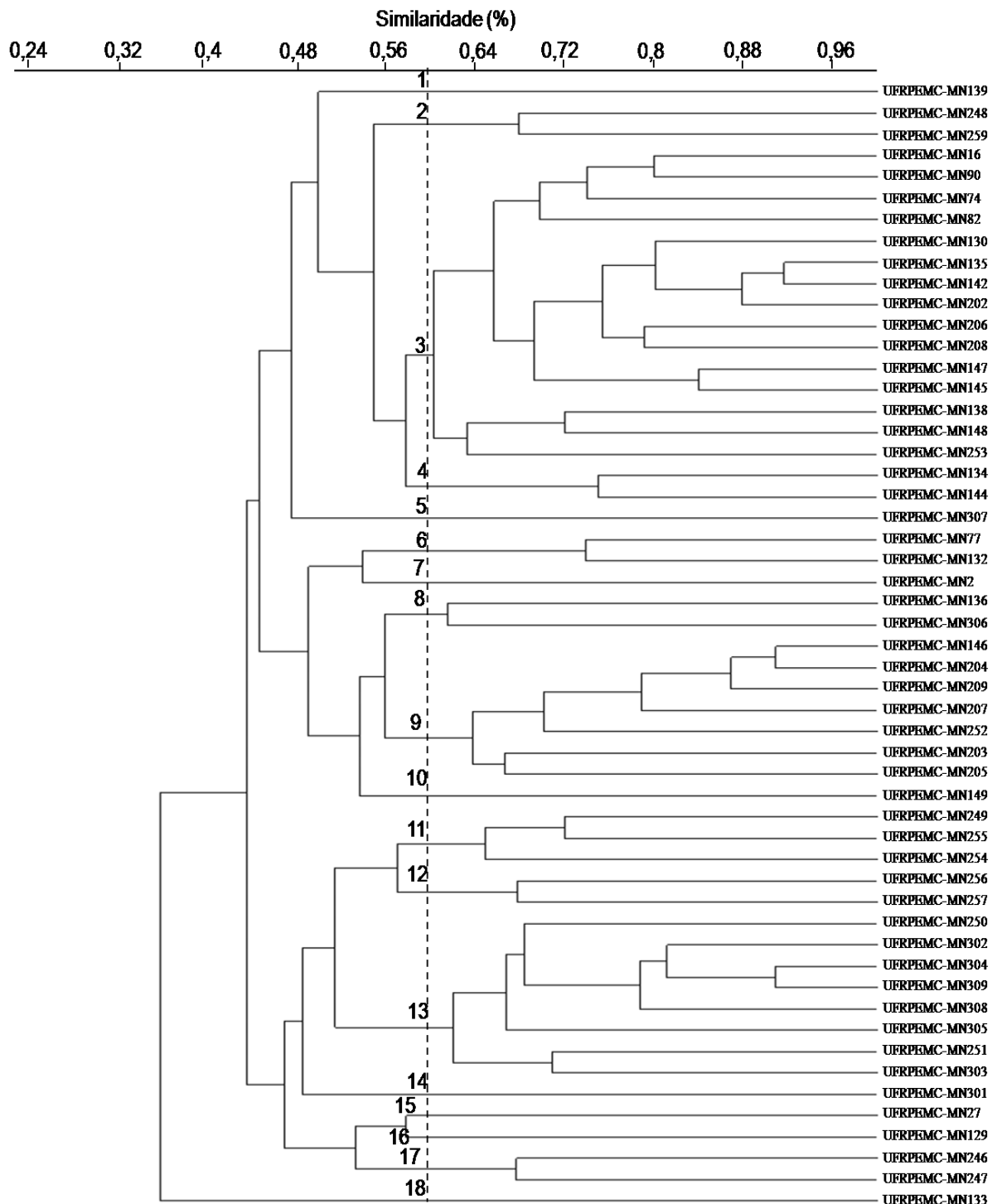


Figura 4. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob mata nativa, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.

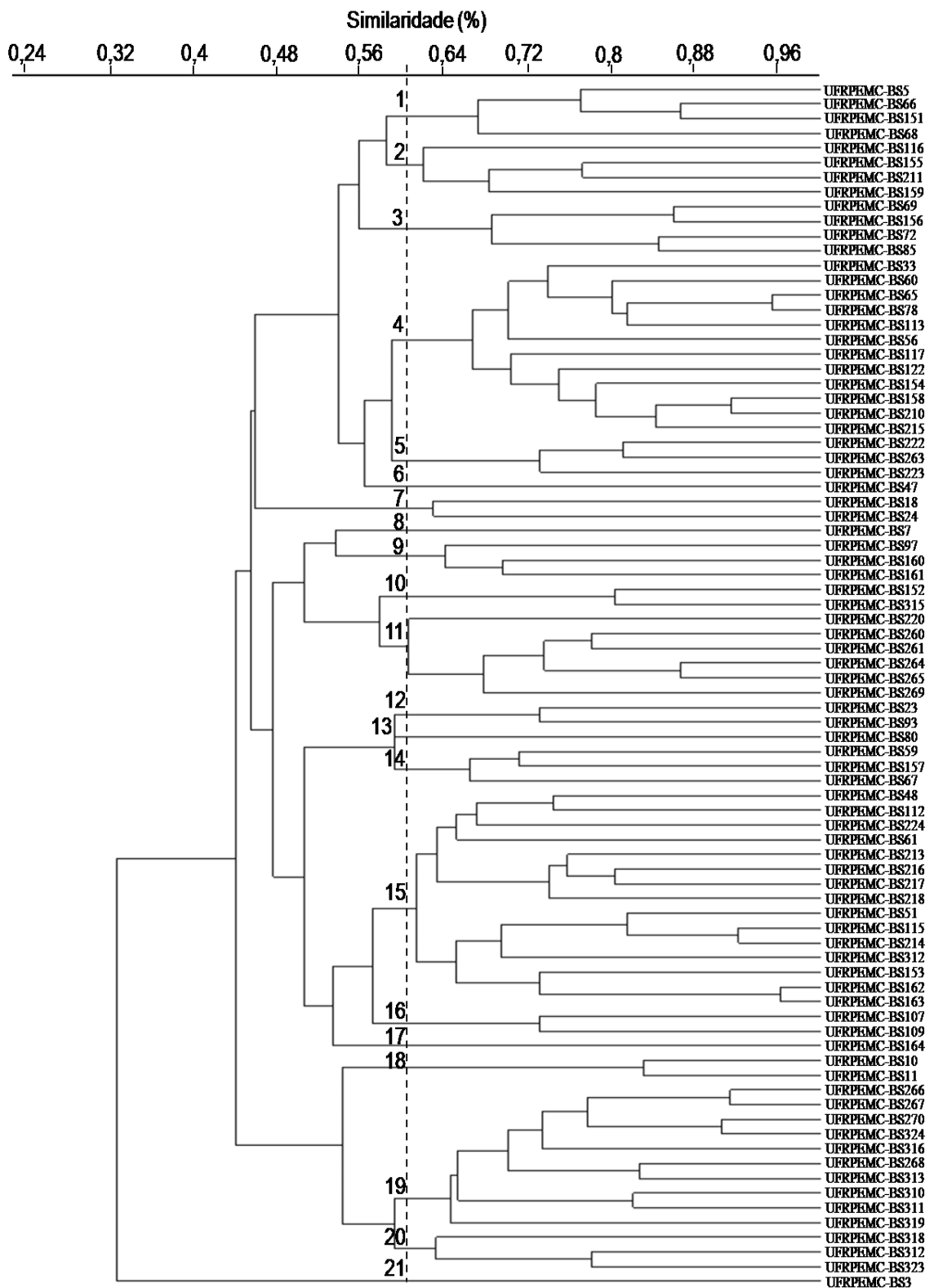


Figura 5. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob bosque de sabiá, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas

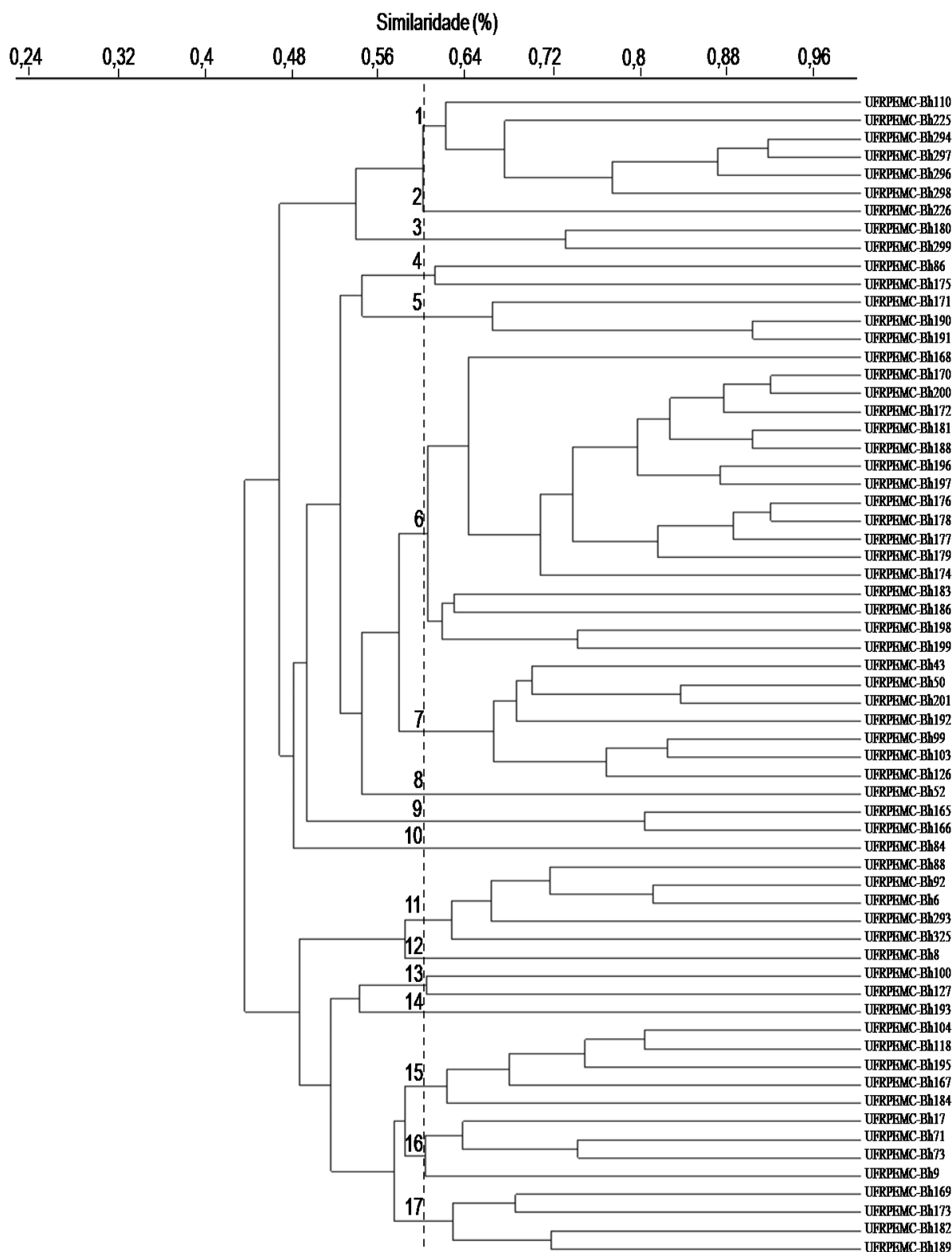


Figura 6. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob *Brachiaria humidicola*, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.

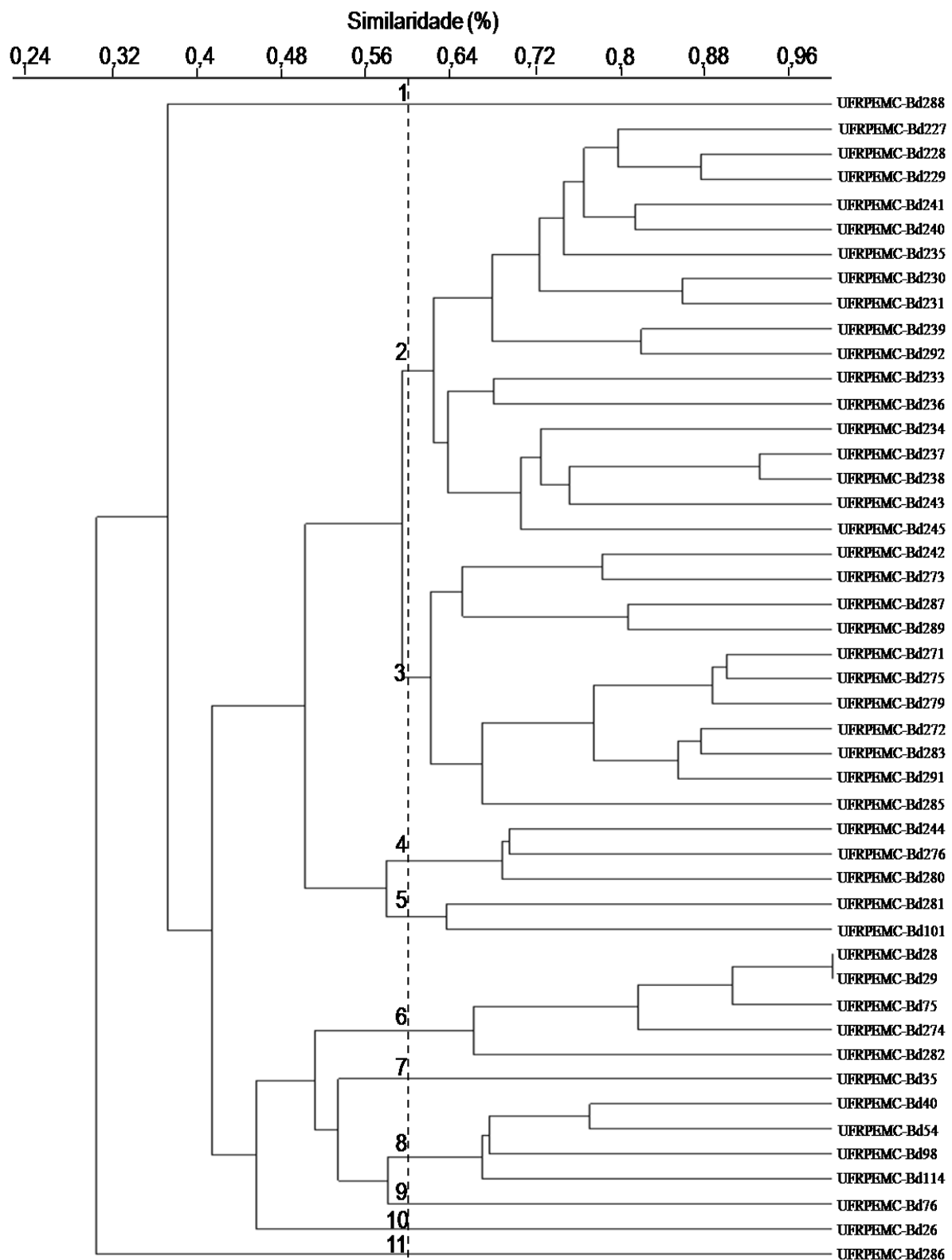


Figura 7. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados de sabiá, oriundos de solo sob *Brachiaria decumbens*, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.

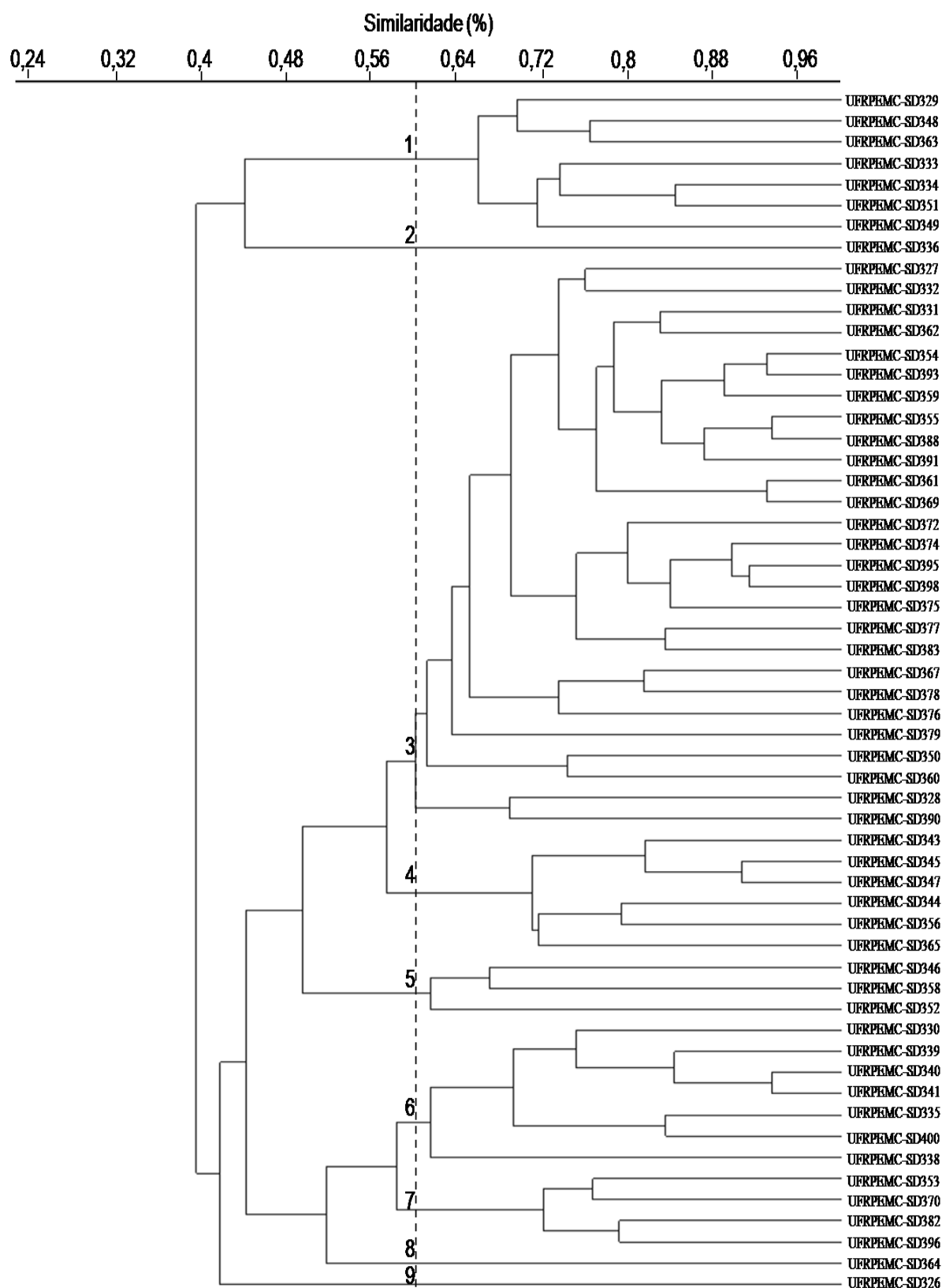


Figura 8. Dendrograma de similaridade a 60% dos isolados obtidos de sabiá direto do campo, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.

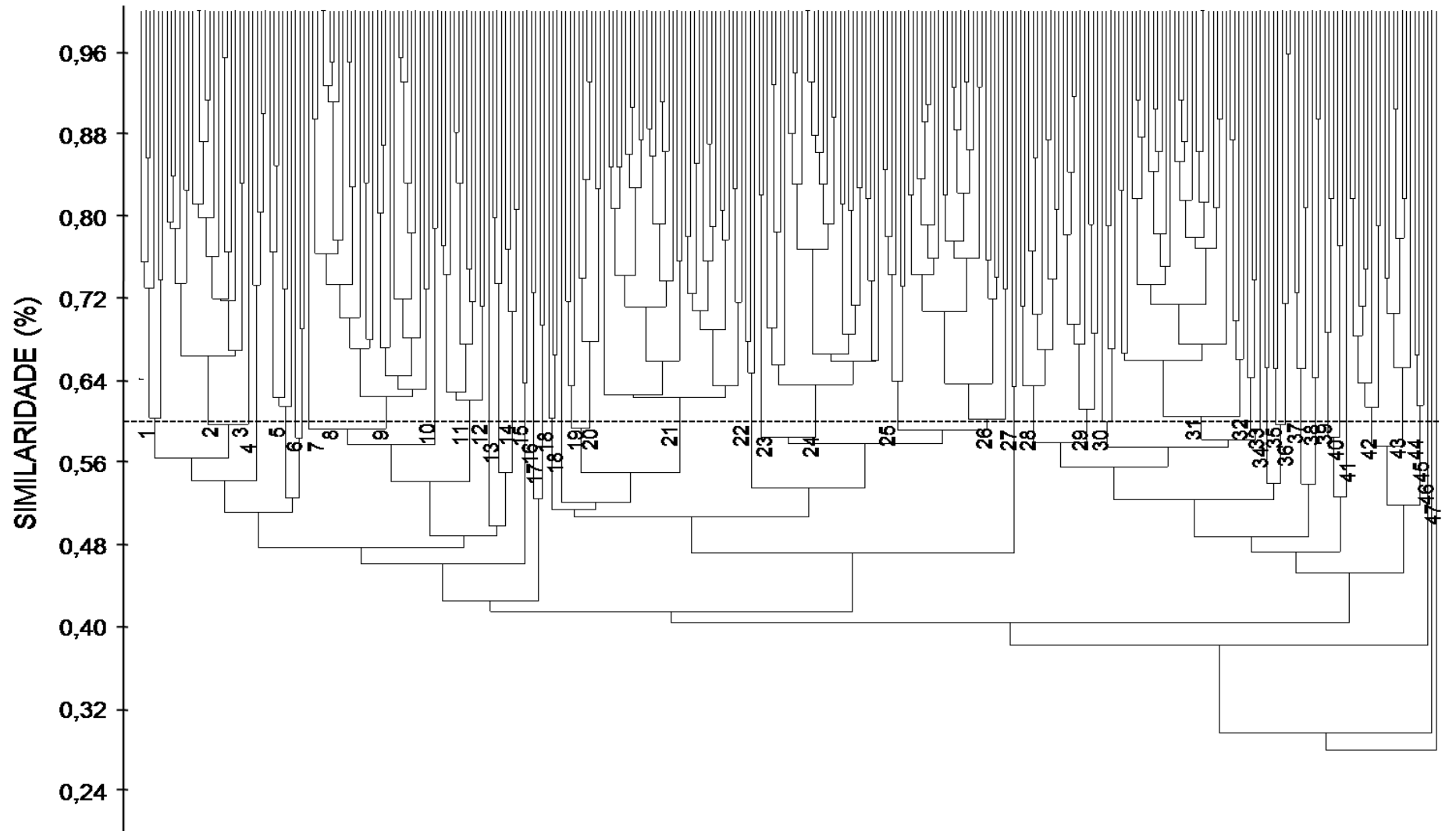


Figura 9. Dendrograma de similaridade de todos os isolados de sabiá, construído a partir do agrupamento das características morfofisiológicas.

4.2.7. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA

O índice de diversidade de Shannon-Weaver revelou maior diversidade nos isolados da cobertura BS ($H = 4,07$) e menor em Bd ($H = 3,29$), com alta uniformidade pelo índice de Pielou variando de 0,85 em Bd a 0,95 em Bh (**tabela 15**).

Apesar dos índices serem inversamente proporcionais, como relatado por Simpson (1949) e Berger e Parker (1970), a ocorrência simultânea de menores diversidade e dominância encontrada nos isolados da cobertura Bd também foi observadas em outros estudos, como Santos et al. (2007), que encontraram isto em isolados rizobianos de amendoim também em solo da zona da mata pernambucana e Roesch et al. (2007) avaliando a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a milho no Rio Grande do Sul.

Tabela 15. Índices de diversidade e uniformidade dos isolados de sabiá obtidos de solos sob diferentes coberturas vegetais.

Cobertura vegetal	Total de isolados	Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H)	Índice de Uniformidade de Pielou (E)
Mata Nativa	53	3,49	0,88
Bosque de Sabiá	82	4,07	0,92
<i>Brachiaria humidicola</i>	64	3,96	0,95
<i>Brachiaria decumbens</i>	47	3,29	0,85
Sabiá direto do campo	57	3,65	0,90
Todas	303	5,34	0,93

Elevados índices de diversidade de Shannon-Weaver também foram obtidos por Martins (2010) ao encontrar um índice de 4,05 em estudo com rizóbios

para *Lotus* spp, e por Vargas et al. (2007) que ao estudar a diversidade genética de rizóbios de acácia negra encontraram um índice de 4,30.

Melloni et al. (2006) estudando a diversidade fenotípica de rizóbios de caupi em solos de mineração em reabilitação, também observaram maior diversidade fenotípica nos isolados rizobianos de solos vegetados com leguminosas, assim como, Lima et al. (2009) também observaram alta diversidade dos isolados de solos sob diferentes usos, em estudo com rizóbios de siratro em solos da Amazônia.

Foi verificado que a cobertura vegetal influenciou na diversidade dos isolados, como observado por Jesus et al. (2005), ao encontrarem diferença de quase 0,5 entre os índices de diversidade de três sistemas de uso de solo da Amazônia, em estudo com rizóbios de siratro.

E resultado semelhante de índice de uniformidade de Pielou também foi encontrado por Roesch et al., (2007), avaliando a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a milho no norte do Rio Grande do Sul.

5. CONCLUSÕES

A população de rizóbios estudados apresenta elevada diversidade morfofisiológica, e, portanto tem boa probabilidade de apresentar diferenças em outras características como o potencial para fixação biológica de nitrogênio e uso na produção de inoculantes.

A redução do pH do meio não aparenta ser o principal mecanismo de indução da solubilização do fosfato bi-cálcico *in vitro*.

A ausência de ligação entre produção de muco e resistência a acidez, alumínio, salinidade, antibióticos e herbicidas indica que este mecanismo não deve ser considerado como importante para a resistência a estes estresses ambientais *in vitro*.

LITERATURA CITADA

ALEXANDER, M. Most-probable-number method for microbial populations. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L.; ENSMINGER, L. E.; CLARK, F. E.; DINAUER, R. C. (Ed.). *Methods of soil analysis. Part. Chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy, Inc., 1965. p. 1467-1472.

ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil* [S.I.], v. 287, n. 1, p. 35-41, 2006.

APPUNU, C.; DHAR, B. Symbiotic effectiveness of acid-tolerant Bradyrhizobium strains with soybean in low pH soil. *African Journal of Biotechnology* [S.I.], v. 5, n. 10, p. 842-845, 2006.

ASSIS JUNIOR, R. N.; ALMEIDA, R. T.; VASCONCELOS, I. Seleção de estirpes de *Rhizobium* sp. em sabiá, *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Ciência Agrônômica* [S.I.], v. 17, p. 101-105, 1986.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998.

BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium elkanii* ESTIRPE BR 29 EM MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES VALORES DE pH INICIAL. *Ciência e Agrotecnologia* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* [S.I.], v. 45, n. 4, 1966.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. *Ecology: individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1996.

BERGER, W. H.; PARKER, F. L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Science* [S.I.], v. 168, n. 3937, p. 1345-1347, 1970.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.

CARVALHO, P. C. F.; POLI, C. H. E. C.; NABINGER, C. Comportamento ingestivo de bovinos em pastejo e sua relação com a estrutura da pastagem. In: *Pecuária 2000: a pecuária de corte do III Milênio*, Pirassununga. UNESP, 2000. p.CD-ROM.

CARVALHO, P. E. R. Sabiá - *Mimosa caesalpiniiifolia*. In: FLORESTAS, E. (Ed.). *Circular Técnica*. v. 135. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2007. Cap. 10.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum.Agronomy* [S.I.], v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010a.

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

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 58, n. 9, p. 2174-2179, 2008.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 51, p. 1729-1735, 2001.

COSTA, G.S.; FRANCO, A. A.; DAMASCENO, R. N.; FARIA, S. M. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [S.I.], v. 28, n. 5, p. 919-927, 2004.

COSTA, G.S.; ANDRADE, A.G.; FARIA, S.M. Aporte de nutrientes pela serrapilheira de *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) com seis anos de idade. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, Ouro Preto. Do substrato ao solo: trabalhos voluntários. Viçosa: Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, 1997. p. 344-354.

COSTA, M. G. O sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). *Boletim Técnico*. v. 4. Areia: UFPB, 1983. p. 16.

CUADRADO, B.; GUILLERMO RUBIO, WINSTON SANTOS. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. Vol. 38, n.1, p.78-104, 2009.

DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R.; KONINGS, W. N.; BOOTH, I. R.; POOLE, R. K.; KRULWICH, T. A.; ROWBURY, R. J.; STOCK, J. B.; SLONCZEWSKI, J. L.; COOK, G. M.; PADAN, E.; KOBAYASHI, H.; BENNETT, G. N.; MATIN, A.; SKULACHEV, V. Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. *Novartis Foundation Symposium* [S.I.], v. 221, p. 4-18, 1999.

DÖBEREINER, J. Efeito da inoculação de sementeiras de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [S.l.], v. 1, p. 301-305, 1967.

DONATE-CORREA, J.; LEÓN-BARRIOS, M.; HERNÁNDEZ, M.; PÉREZ-GALDONA, R.; ARCO-AGUILAR, M. Different *Mesorhizobium* species sharing the same symbiotic genes nodulate the shrub legume *Anagyris latifolia*. *Systematic and Applied Microbiology* [S.l.], v. 30, n. 8, p. 615-623, 2007.

DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; LIMA, M. F. *Mimosa caesalpinifolia* Benth.: estudos de melhoramento genético realizados pela EMBRAPA Semi-Árido. In: QUEIROZ, M.; GOEDERT, S. R. R. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro*. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1999. p. On-line.

ELSHEIKH, E. A. E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: A review. *Annals of Applied Biology* [S.l.], v. 132, p. 507-524, 1998.

EMBRAPA. *Manual de análises químicas de solos*. Brasília EMBRAPA, 1999.

ESIOBU, N.; ARMENTS, L. & IKE, J. Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research*, v.12, p.133-144, 2002.

FARELEIRA, P.; MATOS, N.; FERREIRA, E.; MARQUES, J. F. Tolerância ao sal e às altas temperaturas de estirpes de *Sinorhizobium* provenientes de zonas secas do Alentejo. *Revista de Ciências Agrárias* [S.l.], v. 30, n. 2, p. 187-198, 2007.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. *CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE GUANDU [(Cajanus cajan (L.) MILLSP.) (2009). 183 f. Tese (Dr.) - Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, UFRRJ, Seropédica, 2009.*

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

FERNANDES, M.M.; PEREIRA, M. G.; MAGALHÃES, L. M. S.; CRUZ, A. R.; GIÁCOMO, R. G. APORTE E DECOMPOSIÇÃO DE SERAPILHEIRA EM ÁREAS DE FLORESTA SECUNDÁRIA, PLANTIO DE SABIÁ (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) E ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) NA FLONA MÁRIO XAVIER, RJ *Ciência Florestal* [S.l.], v. 16, n. 2, p. 163-175, 2006.

FERREIRA, R. L. C.; LIRA JUNIOR, M. A.; ROCHA, M. S.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; BARRETO, L. P. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). *Revista Arvore* [S.l.], v. 31, n. 1, p. 7-12, 2007.

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 Ciência do Solo*, v.34, p.1113-1123, 2010.

FREIRE, J. L.; DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; LIRA, M. A.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; FREITAS, E. V. Deposição e composição química de serrapilheira em um bosque de sabiá. *Revista Brasileira de Zootecnia* [S.I.], v. 39, n. 8, p. 1650-1658, 2010.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* [S.I.], v. 4, n. 1, p. XIX-XX, 2001.

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

_____. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HOSNEY,I., ABD EL-MAKSOU, H.K. AND ABD-EL-ZAHER, F.H. *Intrinsic Antibiotic Resistance (Iar) For Differentiation Of Rhizobia*. In: Ecological Studies On Soil Indigenous Rhizobia In Egypt. "Scientific Research Outlook & Technology Development In The Arab World (Sro4)", p. 11-14, 2006.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa, 1994. p. 45-62.

ILMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble A1PO4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 265-270, 1995.

ITOH, K.; TASHIRO, Y.; UOBE, K.; KAMAGATA, Y.; SUYAMA, K.; YAMAMOTO, H. Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdA* alpha and *cad4*, homologous with genes encoding 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.2110–2118, 2004.

JAQUES, R.J.S.; PROCOPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, A.A. Sensibilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* ao glyphosate. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 57, n.1, p. 028-033, jan/fev, 2010.

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

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BÉNA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 54, n. 6, p. 2269-2273, 2004.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KUMAR, A.S.; MODY, K. & JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Bas. Microbiol.*, 47:103–117, 2007.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). *Plant and Soil* [S.I.], v. 319, n. 1, p. 127-145, 2009.

LIN, D. X.; WANG, E. T.; TANG, H.; HAN, T. X.; HE, Y. R.; GUAN, S. H.; CHEN, W. X. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 58, n. 6, p. 1409-1413, 2008.

MAGURRAN, A.E. *Measuring Biological Diversity*. Oxford, UK: Blackwell. 2004. 256p.

MAHDHI, M.; FTERICH, A.; REJILI, M.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D.; MARS, M. Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. *Annals of Microbiology* [S.I.], p. 1-8, 2011.

MARTINS, A. F. *Rizóbios, para Lotus spp, resistentes à acidez e a salinidade do solo* (2010). 92 f. Dissertação (MSc) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

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 Ciência do Solo* [S.I.], v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MIKANOVÁ, O.; NOVÁKOVÁ, J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinna Vyroba* [S.I.], v. 48, n. 9, p. 397-400, 2002.

MOÇO, M. K. D. S.; DA GAMA-RODRIGUES, E. F.; DA GAMA-RODRIGUES, A. C.; CORREIA, M. E. F. Characterization of soil fauna in different vegetation covers in the

Northern Fluminense Region (RJ). *Caracterização da fauna edáfica em diferentes coberturas vegetais na região norte fluminense* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 555-564, 2005.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. *Nature* [S.I.], v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 170, p. 265-270, 1999.

NCCLS/CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical and Laboratory Standards Institute) - *Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana*, 15º Suplemento Informativo. Tradução: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 15. ed. v.25, n.1. 2005. 177 p. (CLSI document M100-S15). Substitui a Norma M100-S14; Apresenta tabelas atualizadas para as normas M2-A8 e M7-A6.

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

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHAES, H. P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia* [S.I.], v. 30, n. 3, p. 203-208, 1999.

PIELOU, E. C. The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. *Journal of Ecology* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 607-613, 1959.

RAZA, S.; JORNSGARD, B.; ABOU-TALEB, H.; CHRISTIANSEN, J. L. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 32, n. 6, p. 379-383, June 2001.

REJILI, M.; LORITE, M. J.; MAHDHI, M.; PINILLA, J. S.; FERCHICHI, A.; MARS, M. Genetic diversity of rhizobial populations recovered from three *Lotus* species cultivated in the infra-arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science* [S.I.], v. 19, n. 9, p. 1079-1087, 2009.

RICOTTA, C. A parametric diversity measure combining the relative abundances and taxonomic distinctiveness of species. *Diversity and Distributions* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 143-146, 2004.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; KROPPESTEDT, R. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 47-53, 2003.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversity of diazotrophic endophytic bacteria associated with maize plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [S.I.], v. 31, n. 6, p. 1367-1380, 2007.

SÁ, E. L. S. *DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE FEIJOEIRO (Phaseolus vulgaris) EM SOLOS ÁCIDOS DE CUNHA - SP.* (2001). 109 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, 2001.

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* [S.I.], v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; COSTA, M.D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E.A. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. *Planta daninha*, Viçosa-MG, v. 24, n. 3, p. 457-465, 2006.

SANTOS, J.B.; JACQUES, R.J.S.; PROCÓPIO, S.O.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A. Efeitos de Diferentes Formulações Comerciais de Glyphosate sobre Estirpes de *Bradyrhizobium*. *Planta daninha*, Viçosa-MG, v. 22, n. 2, p. 293-299, 2004.

SCHMITT, H.; STOOB, K.; HAMSCHER, G.; SMIT, E. & SEINEN, W. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microbiology Ecology*, v.51, p.267-276, 2006.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology* [S.I.], v. 33, n. 5, p. 269-274, 2010.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [S.I.], v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [S.I.], v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity [16]. *Nature* [S.I.], v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.

SINCLAIR, M. J.; EAGLESHAM, A. R. J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 247-251, 1984.

SOUSA, C. A. *SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS* (2010). 49 f. Dissertação (MSc) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, UFRPE, Recife, 2010.

SPRENT, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? *Plant and Soil* [S.I.], v. 161, n. 1, p. 1-10, 1994.

STROSCHEIN, M. R. D. *CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO EM LUPINUS ALBESCENS* (2007). 83 f. Dissertação (MSc) - Programa de Pós-Graduação Ciência do Solo, UFSM, Santa Maria, 2007.

SUASSUNA, J. *Efeitos da associação do sabiá (Mimosa caesalpiniaefolia Benth.) no comportamento do jacarandá (Dalbergia nigra Fr. Allen.) e da peroba branca (Tabebuia stenocalyx Sprague & Stapf) na zona da mata de Pernambuco*. 179 f. Dissertação (Mestrado) - Biologia, UFRPE. Programa de Pós-graduação em Botânica, Recife, 1982.

TEAUMROONG, N.; MUROOKA, Y.; BOONKERD, N. Acid tolerance and antibiotic resistance of some strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. *Suranaree Journal of Science and Technology*, v.2, n.2, 1995.

THRALL, P. H.; BROADHURST, L. M.; HOQUE, M. S.; BAGNALL, D. J. Diversity and salt tolerance of native *Acacia* rhizobia isolated from saline and non-saline soils. *Austral Ecology* [S.I.], v. 34, n. 8, p. 950-963, 2009.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDEN?A, D.; MATEOS, P. F.; NEZ-MOLINA, E.; ZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 1985-1989, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 53, n. 6, p. 1979-1983, 2003.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.

VAN GESTEL, M.; LADD, J. N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: Influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biology and Biochemistry* [S.I.], v. 23, n. 4, p. 313-322, 1991.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [S.I.], v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de Acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* [S.I.], v. 31, n. 4, p. 647-654, 2007.

VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R. T.; MENDES FILHO, P. F.; LANDIM, C. M. U. Comportamento de 13 estirpes de *Rhizobium* sp. em simbiose com sabiá, *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Ciência Agrônômica* [S.I.], v. 15, p. 133-138, 1984.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCON, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and Soil* [S.I.], v. 287, n. 1-2, p. 77-84, 2006.

VIEIRA, E. L.; CARVALHO, F. F. R.; BATISTA, A. M. V.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; SILVA, M. J.; SILVA, E. M. B. Composição química de forrageiras e seletividade de bovinos em bosque-de-sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) nos períodos chuvoso e seco. *Revista Brasileira de Zootecnia* [S.I.], v. 34, p. 1505-1511, 2005.

VINCENT, J. M. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, 1970.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ-LARA, I. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas In: MARTÍNEZ-ROMERO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. C. (Ed.). *Microbios en línea*. Mexico: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno, 2006. p. online.

WOLDA, H. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* [S.I.], v. 50, n. 3, p. 296-302, 1981.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a

cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils* [S.I.], v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. TOLERÂNCIA DE RIZÓBIO DE FEIJÃO-CAUPI À SALINIDADE E À TEMPERATURA EM CONDIÇÃO IN VITRO *Revista Caatinga* [S.I.], v. 20, n. 4, p. 1-9, 2007.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, Brasília, v.20, p.391-411, 2003.

APÊNDICE A

Tabela 16. Principais características dos grupos de similaridade formados nas diferentes coberturas vegetais.

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Mata Nativa	1	1	Absorveu corante, colônia ≤ 2mm, amarela, drop-like, ondulada, semi transparente, lisa, com pouco muco, consistência gomosa e pH neutro.	Solubilizadora de P-Ca, tolerante a salinidade, acidez e alumínio, resistente a AMP, CTX e VAN, e sensível aos herbicidas e demais antibióticos.
	2	2	Não absorveu corante, colônias > 2mm, bege, circular, convexa, inteira, lisa, com moderada produção de muco e consistência gomosa.	Tolerantes a acidez e alumínio, resistentes a AMP, CTX e TET, e sensíveis a CIP, CLO, GEN, KAN, RIF, VAN e todos herbicidas.
	3	15	Colônias > 2mm, circular, inteira e lisa.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerantes a 3% de sal e acidez + alumínio e sensíveis a CIP, CLO, GEN, KAN, NAL, RIF e todos herbicidas.
	4	2	Idem grupo 3, mais coloração bege, não absorção de corante, convexa, semi transparente, moderada produção de muco e consistência gomosa.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerantes a salinidade, resistentes a AMP, CTX e VAN e sensíveis aos demais antibióticos, todos herbicidas e acidez + Al.
	5	1	Idem grupo 3, mais absorção de corante, colônia bege, drop-like, abundante produção de muco, consistência gomosa e pH ácido.	Solubilizadora de P-Ca, tolerante a acidez e alumínio e sensível a todos antibióticos e herbicidas.
	6	2	Não absorveu corante, colônias ≤ 2mm, bege, puntiforme, convexa, inteira, lisa, semi transparente, consistência gomosa e pH neutro.	Idem anterior
	7	1	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, bege, puntiforme, convexa, inteira, lisa, transparente, pouco muco, consistência gomosa e pH ácido.	Solubilizadora de P-Ca, tolerante a acidez, resistente a AMP e CTX e sensível aos demais antibióticos e herbicidas.
	8	2	Idem grupo 3, mais colônias bege, moderada produção de muco, consistência butírica e pH ácido.	Tolerantes a salinidade, a acidez e alumínio e sensíveis a todos herbicidas e antibióticos, exceto CTX e VAN.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Mata Nativa	9	7	Colônia \leq 2mm, inteira, lisa, semi transparente e consistência de muco butírica.	Tolerantes a salinidade e sensíveis a CIP, CLO, EST, GEN, KAN, NAL, RIF e TET e todos herbicidas.
	10	1	Absorveu corante, colônia \leq 2mm, bege, convexa, filamentosa, rugosa, semi transparente, escassa produção de muco, consistência butírica e pH ácido.	Idem grupo 1, exceto resistência a AMP e VAN.
	11	3	Idem grupo 9, mas colônia bege e com pouca produção de muco.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerantes a acidez e alumínio, AMP e CTX, e sensíveis a CIP, CLO, GEN, KAN, NAL, RIF e herbicidas.
	12	2	Não absorveu corante, colônia \leq 2mm, bege, denteada, rugosa, semi transparente e pH neutro.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerantes a acidez e alumínio, AMP, CTX, EST e TET, e sensíveis a CIP, CLO, GEN, KAN, RIF, VAN e herbicidas.
	13	8	Colônias com bordas inteiras e lisas.	Solubilizadoras de P-Ca, resistentes a acidez e alumínio, AMP, CTX, NAL e TET.
	14	1	Idem grupo 3, mais absorção de corante, colônia amarela, lente, semi transparente, moderada produção de muco, consistência butírica e pH ácido.	Solubilizadora de P-Ca, tolerantes a acidez e alumínio, AMP, CTX e VAN, e sensíveis a CIP, CLO, EST, GEN, KAN, RIF, TET e herbicidas.
	15	1	Absorveu corante, colônia \leq 2mm, amarela, puntiforme, plana, denteada, semi transparente, papilosa, pouco muco, consistência gomosa e pH neutro.	Idem anterior, exceto solubilização de P-Ca.
	16	1	Absorveu corante, colônia \leq 2mm, amarela, puntiforme, convexa, inteira, transparente, lisa, escasso muco, consistência butírica e pH neutro.	Resistente a sal, acidez, alumínio, AMP, CIP, CLO, CTX, EST, KAN, NAL e Round-up.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Mata Nativa	17	2	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, amarela, puntiforme, plana, inteira, opaca, lisa, escasso muco, consistência gomosa e pH neutro.	Solubilizadoras de P-Ca, resistente a acidez, alumínio, AMP, CTX e TET e sensíveis a CIP, CLO, GEN, KAN, RIF, VAN, 2,4-D e Round-up.
	18	1	Idem grupo 14, porém elevação convexa ao invés de lente.	Tolerante a salinidade e sensível a antibióticos, herbicidas, acidez e alumínio.
Bosque de Sabiá	1	4	Idem grupo 3 de mata nativa, mais colônias bege, semi transparente e muco de consistência gomosa.	Solubilizadoras de P-Ca, resistentes a acidez, AMP, CTX e VAN. Sensível CIP, CLO, EST, GEN, KAN, RIF, TET e herbicidas.
	2	5	Idem grupo 3 de mata nativa, mais consistência gomosa e não absorção de corante.	Tolerante a salinidade, acidez e alumínio, e sensíveis a CIP, CLO, EST, GEN, KAN, NAL, RIF, TET e herbicidas.
	3	4	Idem grupo 3 de mata nativa, mais colônias semi transparente, moderada produção muco, consistência gomosa e reação neutra.	Idem grupo 5 de mata nativa.
	4	12	Idem grupo 3 de mata nativa, mais absorção de corante e reação ácida.	Idem grupo 2, exceto sensibilidade a EST.
	5	3	Idem grupo 8 de mata nativa, mais absorção de corante e colônias plana.	Tolerância a salinidade, acidez de 5,5, AMP, CTX e TET e sensibilidade aos demais antibióticos, exceto NAL.
	6	1	Absorveu corante, colônia > 2mm, branca, circular, plana, inteira, transparente, papilosa, abundante muco, consistência butírica e pH ácido.	Idem grupo 2, mais sensibilidade a AMP, CTX e VAN.
	7	2	Não absorveu corante, colônias convexa, inteira, transparente, lisa, gomosa e reação ácida.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerância a acidez e alumínio e sensíveis a herbicidas, AMP, CLO, CTX, EST, GEN, KAN, RIF, TET e VAN.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Bosque de Sabiá	8	1	Idem grupo 17 de mata nativa, porém com pouco muco e pH ácido, ao invés de escasso e pH neutro.	Idem grupo 5 de mata nativa, porém com resistência a AMP, CTX, NAL e VAN.
	9	3	Colônias > 2mm, amarela, umbilicada, inteira, semi transparente, lisa, pouco muco e reação neutra.	Resistentes a acidez e alumínio e VAN, sensível a herbicidas e demais antibióticos, exceto CTX.
	10	2	Idem grupo 11 de mata nativa, mais não absorção de corante e colônia com elevação lenta.	Solubilizadoras de P-Ca, tolerantes a 3% de sal, acidez e alumínio, AMP, CTX e VAN, e sensível a herbicidas e demais antibióticos, exceto EST.
	11	6	Colônias > 2mm, inteira, semi transparente, moderado muco e consistência butírica.	Idem grupo 13 de mata nativa, exceto resistência a NAL.
	12	2	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, convexa, inteira, semi transparente, pouco muco e pH ácido.	Idem grupo 5 de mata nativa.
	13	1	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, bege, puntiforme, convexa, filamentosa, semi transparente, lisa, escasso muco, gomoso e reação ácida.	Idem grupo 5 de mata nativa, exceto resistência a alumínio.
	14	3	Absorveu corante, colônias ≤ 2mm, amarela, filamentosa, semi transparente, pouco muco e gomosa.	Idem grupo 18 de mata nativa, exceto resistência a alumínio.
	15	15	Colônia ≤ 2mm, puntiforme.	Não solubilizou fosfato, tolerância a salinidade e acidez, sensível a herbicidas, CIP, CLO, GEN, KAN, NAL e RIF.
16	2	Absorveu corante, colônia ≤ 2mm, puntiforme, convexa, semi transparente, lisa e consistência gomosa.	Não solubilizou fosfato, tolerância a salinidade, acidez, alumínio, CLO, CTX, NAL, RIF, TET e VAN e sensível aos herbicidas, AMP, CIP, GEN e KAN.	

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Bosque de Sabiá	17	1	Absorveu corante, colônia \leq 2mm, bege, puntiforme, plana, ondulada, semi transparente, lisa, pouco muco, consistência butírico e pH ácido.	Idem grupo 1 de mata nativa, exceto resistência a AMP.
	18	2	Não absorveu corante, colônias > 2mm, amarela, circular, convexa, inteira, semi transparente, lisa, gomosa e pH neutro.	Solubilizou fosfato, resistente a acidez, AMP, CIP, CTX, NAL, VAN e Paraquat, sensível a EST, GEN, KAN, RIF e TET.
	19	10	-	Solubilizou fosfato, resistente a todos antibióticos e acidez 5,5.
	20	3	Colônia \leq 2mm, plana, semi transparente, pouco muco e reação ácida.	Não solubilizou fosfato, resistente a acidez e alumínio, AMP, CTX e NAL.
	21	1	Idem grupo 9, com consistência viscosa e moderada quantidade de muco, ao invés de pouco muco.	Solubilizou P-Ca e foi sensível a acidez e alumínio, todos herbicidas e antibióticos, exceto CTX.
<i>Brachiaria humidicola</i>	1	6	Colônias \leq 2mm, semi transparente, lisa e pouco muco.	Não solubilizou fosfato, resistente a salinidade, CTX e NAL.
	2	1	Idem grupo 16 de mata nativa, porém sem absorver corante, com colônia branca e semi transparente.	Solubilizou P-Ca, resistente a salinidade, acidez e alumínio, AMP, CTX, NAL, TET e Paraquat.
	3	2	Não absorveu corante, colônia \leq 2mm, amarela, puntiforme, plana, inteira, papilosa, escasso muco, gomosa e reação ácida.	Resistente a acidez, alumínio, 3% de NaCl, AMP, CTX, EST e NAL, e sensível a GEN, KAN e todos herbicidas.
	4	2	Absorveu corante, colônia \leq 2mm, bege, inteira, lisa, pouco muco e pH neutro.	Solubilizadoras de fosfato, resistente a 3% de sal, acidez, alumínio e VAN, sensível a CIP, CLO, EST, GEN, KAN, NAL, TET e herbicidas.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
	5	3	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, bege, plana, inteira, semi transparente e lisa.	Solubilizadoras de fosfato, resistente a salinidade e sensível a acidez, alumínio, CIP, CLO, EST, GEN, KAN, NAL, RIF, TET, VAN e herbicidas.
	6	17	Colônia ≤ 2mm, bege, puntiforme e reação ácida.	Idem grupo 9 de mata nativa, mais resistência a acidez 5,5.
	7	7	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, puntiforme, convexa, inteira, semi transparente e lisa.	Idem grupo 2 de bosque de sabiá, exceto sensibilidade a CLO e TET.
	8	1	Idem grupo 12 de mata nativa, porém com coloração amarela, plana, pouco muco e pH ácido.	Idem grupo 8 de mata nativa, porém AMP ao invés de VAN.
<i>Brachiaria humidicola</i>	9	2	Não absorveu corante, colônias > 2mm, bege, irregular, plana, inteira, semi transparente, lisa, pouco muco, butírico e pH ácido.	Idem grupo 2 de bosque de sabiá mais solubilização de P-Ca.
	10	1	Idem grupo 13 de bosque de sabiá, porém amarela e reação neutra.	Idem grupo 5 de mata nativa mais tolerância a salinidade.
	11	5	Colônia bege, circular, inteira, semi transparente, lisa e gomosa.	Resistente a acidez, alumínio, AMP, CTX e VAN, e sensível a Paraquat.
	12	1	Absorveu corante, colônia > 2mm, bege, circular, convexa, inteira, transparente, lisa, moderado muco, gomoso e pH neutro.	Idem grupo 9 de bosque de sabiá, sem exceção a CTX.
	13	2	Colônia > 2mm, amarela, circular, convexa, inteira, lisa, moderado muco, gomosa e reação ácida.	Resistente a acidez, alumínio, CLO, RIF e VAN, e sensível aos herbicidas, CIP, EST, GEN e KAN.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	Nº de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
	14	1	Idem grupo 12, porém com abundante produção de muco e pH ácido.	Idem grupo 10.
<i>Brachiaria humidicola</i>	15	5	Idem grupo 3 de mata nativa, mais não absorção de corante e coloração bege.	Solubilizou P-Ca, resistente a salinidade, acidez e sensível aos herbicidas e antibióticos, exceto AMP, CTX, TET e VAN.
	16	4	Colônia > 2mm, circular, inteira, semi transparente, moderado muco, gomoso e reação ácida.	Resistente a 3% de sal, acidez, alumínio e todos herbicidas e antibióticos, exceto AMP, CTX e EST.
	17	4	Idem grupo 3 de mata nativa, mais moderada produção de muco e reação ácida.	Solubilização de fosfato, resistência a 3% de sal, acidez 5,5 e sensibilidade a todos herbicidas e antibióticos, exceto AMP.
	1	1	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, amarela, puntiforme, plana, filamentosa, semi transparente, rugosa, pouco muco, gomoso, reação ácida.	Idem grupo 5 de mata nativa.
	2	17	Não absorveu corante, inteira e lisa.	Resistente a acidez, alumínio, AMP, NAL e TET. Sensível a GEN e KAN.
<i>Brachiaria decumbens</i>	3	11	Colônia semi transparente.	Idem grupo 13 de mata nativa mais resistência a CLO.
	4	3	Idem grupo 1 de <i>Brachiaria humidicola</i> mais não absorção de corante e borda inteira.	Solubilizou fosfato, resistente a acidez e alumínio, AMP, CTX e TET. Sensível aos demais antibióticos e herbicidas.
	5	2	Idem grupo 17 de mata nativa, porém semi transparente ao invés de opaca.	Resistente a acidez e alumínio, CTX e TET. Sensível a CLO, EST, GEN, KAN, NAL, RIF e herbicidas.

OLIVEIRA, C.S. Diversidade Fenotípica de Rizóbios Isolados de Sabiá Nativos de...

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
<i>Brachiaria decumbens</i>	6	5	Colônias > 2mm, bege, circular, semi transparente, lisa e reação ácida.	Resistência a acidez 5,5 e sensível a todos antibióticos e herbicidas.
	7	1	Absorção de corante, colônia ≤ 2mm, bege, puntiforme, plana, filamentosa, transparente, rugosa, escasso muco, gomosa e reação ácida.	Não solubilizou fosfato, resistente a salinidade, acidez e alumínio. Sensível a todos antibióticos e herbicidas.
	8	4	Absorção de corante, colônia ≤ 2mm, puntiforme, semi transparente, lisa, consistência butírica e pH ácido.	Resistente a 3% de sal, acidez e alumínio. Sensível a CIP, CLO, EST, GEN, KAN, NAL, RIF TET e herbicidas.
	9	1	Absorção de corante, colônia > 2mm, bege, circular, convexa, ondulada, semi transparente, lisa, abundante muco, butírico e pH ácido.	Idem grupo 7, exceto resistência a acidez 4,5 e alumínio.
	10	1	Absorção de corante, colônia ≤ 2mm, amarela, puntiforme, umbonada, inteira, semi transparente, lisa, escasso muco, gomosa e pH ácido.	Idem grupo 10 de <i>Brachiaria humidicola</i> .
	11	1	Não absorveu corante, colônia > 2mm, bege, circular, convexa, denteada, transparente, lisa, abundante muco, viscosa e pH neutro.	Idem grupo 5 de mata nativa.
	1	7	Absorveu corante, colônia > 2mm, amarelo, circular, lisa e reação ácida.	Não solubilizou P-Ca, resistente a acidez e alumínio. Sensível a 4,5% de sal e todos herbicidas e antibióticos, exceto AMP e CTX.
Sabiá direto do campo	2	1	Idem grupo 15 de mata nativa, porém com elevação convexa, escasso muco e pH ácido.	Idem grupo 10 de <i>Brachiaria humidicola</i> menos resistência a pH 4,5+AL.
	3	27	Colônia com superfície lisa.	Resistente a acidez e alumínio.

Continuação...

Cobertura vegetal	Grupo	N° de isolados	Características em comum	
			Culturais	Fisiológicas
Sabiá direto de campo	4	6	Não absorveu corante, colônia > 2mm, bege, circular, inteira, transparente, lisa, abundante muco e gomoso.	Resistência a acidez 4,5 e sensível aos herbicidas e antibióticos, exceto AMP, CTX, TET e VAN.
	5	3	Colônia > 2mm, circular, inteira, semi transparente, lisa, moderado muco e reação neutra.	Idem grupo 5 de mata nativa, exceto AMP, CTX e VAN.
	6	7	Absorveu corante, colônia ≤ 2mm, puntiforme, escasso muco e consistência butírica.	Não solubilizou P-Ca, resistente a 3% de sal, AMP, acidez e alumínio. Sensível a RIF, TET, 2,4-D e Round-up
	7	4	Colônia ≤ 2mm, bege, puntiforme, semi transparente, lisa e reação ácida.	Resistência a 3% de sal, acidez, alumínio e todos antibióticos, exceto RIF e TET.
	8	1	Não absorveu corante, colônia ≤ 2mm, amarela, puntiforme, convexa, denteada, lisa, escasso muco, viscoso e pH neutro.	Não solubilizou fosfato, resistente a acidez, alumínio, AMP e VAN. Sensível aos herbicidas e demais antibióticos.
	9	1	Idem grupo 7 de <i>Brachiaria decumbens</i> , mais colônia plana, inteira e pouco muco.	Idem grupo 7 de <i>Brachiaria decumbens</i> , exceto resistência a 4,5% de sal.

