

## Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.*

CAMPOS, L. L.<sup>1</sup>, MARTINS, M. E.<sup>2</sup>, ELIAS NETO, N.<sup>1</sup> e LOUREIRO, M.F.<sup>3</sup>.\*

<sup>1</sup>Doutorandos do PPG em Agricultura Tropical da FAMEV/UFMT, Av. Fernando Corrêa da Costa, S/N, Coxipó, CEP 78060900. e-mail: llenza@uol.com.br

<sup>2</sup>Aluna PIBIC da FAMEV/UFMT.

<sup>3</sup>Professora Associada do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da FAMEV/UFMT. e-mail: loureiromf@terra.com.br.

### RESUMO

Com o objetivo de caracterizar rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.*, uma leguminosa nativa do Pantanal mato-grossense, foram escolhidos aleatoriamente 10 isolados da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia do solo da UFMT. Os parâmetros avaliados foram crescimento em meio YM com diferentes concentrações salinas (0%, 1,5% e 3%), diferentes níveis de pH iniciais (6,8, 3,0 e 9,0), em duas temperaturas diferentes (28 e 39 °C) e produção de muco. De acordo com as análises todos os isolados apresentaram tolerância à salinidade e à temperatura de 39 °C. O pH alcalino foi mais prejudicial ao crescimento dos isolados que o pH ácido, o que pode estar relacionado à adaptação aos solos ácidos.

Palavras-chave: salinidade, pH, temperatura.

### ABSTRACT

#### Physiologic characterization of rhizobia isolates of root and stem nodules of *Discolobium spp.*

This study aimed to characterize rhizobia isolates of root and stem nodules of *Discolobium spp.*, a native legume of Pantanal. Ten isolated rhizobia were randomly chosen from the culture collection of the Soil Microbiology Laboratory of Federal University of Mato Grosso. The parameters evaluated were: growth in YM medium with different salt concentrations (0%, 1.5% and 3%), different initial pH levels (6.8, 3.0 and 9.0), in two different temperatures (28 and 39 °C), and mucus production. The analyses showed that all isolates were tolerant to salinity and to temperature of 39 °C. The alkaline pH was more harmful than acidic pH to the growth of isolates, which may be related to adaptation to acid soils.

**Keywords:** salinity, pH, temperature.

### INTRODUÇÃO

Embora o Brasil tenha cerca de 2.000 espécies nativas de leguminosas (desde herbáceas até arbóreas) e, apesar da importância prática e econômica do uso da associação leguminosa-rizóbio, poucos estudos são realizados quanto aos fatores fisiológicos e químicos dos solos regionais que afetam as bactérias, a planta e a simbiose entre ambos.

Algumas leguminosas de ocorrência no Pantanal mato-grossense são espécies conhecidas como hidrófitas tropicais ou subtropicais de pântanos, rios ou margens de lagos (DREYFUSRGUESLADHA et al., 1992; LOUREIRO et al., 1994; BOIVIN et al.,

1997), levando à hipótese de uma adaptação evolutiva às condições de alagamento (STEGINK & VAUGHN, 1988; SAUR et al. 1998) e à limitação de nitrogênio nas florestas neotropicais de inundação sendo capazes de fixar nitrogênio em nódulos de caule e raiz.

Apesar de fatores como acidez, temperatura elevada e alta concentração salina (SURANGE et al., 1997) normalmente contribuírem para diminuição da população de microrganismos no solo (WOOD, 1995), sabe-se que alguns apresentam mecanismos de tolerância a esses fatores (WATKIN et al., 2000). O estudo das características culturais e morfológicas dos rizóbios em geral, revela uma ampla diversidade (GRAHAM & PARKER, 1964), sendo bastante significativos e utilizados na identificação taxonômica, constituindo uma ferramenta poderosa na pesquisa por estirpes onde esses fatores constituem limitação para fixação biológica de nitrogênio.

Esses estudos devem ser intensificados para que se compreenda melhor esta associação, a fim de favorecer o aumento da eficiência e da viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas agroflorestais implantados (MARTINS et al., 1997).

Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de espécies de leguminosas do gênero *Discolobium* nativas do Pantanal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.* da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Mato Grosso-UFMT. Depois de escolhidos aleatoriamente dez isolados, sendo cinco isolados de nódulos de raiz (UFMT- 60, 61, 80, 111 e 113) e cinco isolados de nódulos de caule (UFMT- 51, 52, 91, 101 e 112), foi realizada uma repicagem para verificação de pureza em placas contendo meio YMA: extrato de levedura (0,4 g); manitol (10 g); solução 10%  $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$  utilizando-se 1 e 4 mL respectivamente; solução 10%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e NaCl utilizando-se 2 e 1 mL respectivamente; Azul de Bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH) 5 mL; ágar-ágar 15 g.

Para avaliação das características tolerância à salinidade, pH e temperatura utilizou-se o meio de cultivo líquido YM (sem ágar-ágar) e seu crescimento foi mensurado a cada 48 horas por densidade óptica (D.O.) a 540 nm, por um período de dez dias. Utilizou-se a média do crescimento durante esse período.

Para o primeiro parâmetro, os isolados foram cultivados em meio YM com diferentes concentrações de sal (0, 1,5 e 3 %); para a tolerância ao pH os isolados foram cultivados nos seguintes pH's iniciais de cultivo: 3,0, 6,8 e 9,0. Os isolados possuem a capacidade de transformar a coloração desse meio de acordo com seu crescimento. A coloração verde do meio indica reação neutra; amarela indica reação ácida e azul indica básica; para o crescimento em dois níveis de temperatura os isolados foram cultivados em estufas de crescimento a 28 °C e 39 °C . Trabalhos anteriores sugerem essas temperaturas como parâmetro para avaliar esses isolados.

Para produção de muco, cada isolado foi repicado em meio sólido YMA, tendo sido considerado positivo (+) para isolados que produziram muco e negativo (-) quando não foi observado a produção de muco. O período de observação foi de 10 dias de crescimento em estufa a 28 °C. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dezoito tratamentos e cinco repetições. Foram realizados os testes de homogeneidade, análise de variância, e o teste de média segundo Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nas avaliações referentes ao crescimento microbiano em diferentes concentrações salinas são apresentados na Tabela 1. Foi observado que os isolados de nódulos de caule, 91 e 112, foram os que tiveram menor crescimento nas três concentrações avaliadas, indicando, provavelmente, que o menor crescimento esteja relacionado com o isolado. Mesmo assim, o isolado 112, foi o único que obteve crescimento significativo nas concentrações 1,5 e 3,0%

Apesar do isolado 112 ter sido afetado positivamente pelo aumento da concentração salina, dentre o crescimento dos isolados em geral, as diferentes concentrações salinas não afetaram significativamente o crescimento dos isolados, indicando que, provavelmente há relação entre tolerância *in vitro* à salinidade e origem dos microssimbiontes, pois os solos no Pantanal mato-grossense apresentam salinidade elevada (REZENDE FILHO, 2004).

**Tabela 1.** Médias do crescimento microbiano (D.O.540nm) em meio líquido YM em diferentes concentrações salinas.

[sal%]	Isolados de nódulos de caule					Isolados de nódulos de raiz				
	51	52	91	101	112	60	61	80	111	113
0	0,264 aA*	0,230 bA	0,063 dC	0,260 aA	0,105 cC	0,276 aA	0,273 aA	0,242 cA	0,256 bA	0,277 aA
1,5	0,268 aA	0,226 bA	0,084 dC	0,241 bA	0,166 cB	0,275 aA	0,233 bA	0,239 bA	0,247 bA	0,257 aA
3	0,296 aA	0,206 bA	0,083 dC	0,293 aA	0,159 cB	0,259 aA	0,225 bA	0,212 bA	0,226 bA	0,256 aA

Esses resultados estão de acordo com Nóbrega et al.(2004), que constataram que estirpes oriundas do Ceará, de região também com salinidade elevada, estiveram entre as mais tolerantes ao estresse salino. Nejidat (2005) também aponta o ecossistema deserto como fonte potencial para isolamento de bactérias nitrificantes em condição salina.

Shamseldin e Werner (2005), estudando variedades de feijoeiros em solos salinos e alcalinos concluem que provavelmente a eficiência simbiótica está mais relacionada com a variação de genótipos dentre as cultivares leguminosas do que às estirpes de rizóbios tolerantes ou adaptadas à salinidade. Porém, de acordo com Freitas et al. (2007) rizóbios nativos isolados de solos salinos, condição observada nos solos pantaneiros (ALMEIDA et al., 2003; REZENDE FILHO, 2004), são de crescimento rápido, produzem exopolissacarídeos e estão associados à eficiência em fixação de nitrogênio.

De acordo com a reação de pH em meio YMA, para os isolados de nódulos de caule (Tabela 2) 60% acidificaram o meio e 80% produziram muco. Quanto aos isolados de nódulos de raiz, 80% acidificaram o meio YMA e, nesse caso, todos produziram muco. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (1997) que observaram que a produção de muco dos isolados estava associada ao crescimento rápido, sendo a maioria com reação ácida ao meio YMA.

Alta produção de muco (exopolissacarídeos) por *Bradyrhizobium* em YMA também foi observada por Miguel e Moreira (2001) e ainda por Dehio e Bruijn (1992), afirmando que estirpes de *Rhizobium sp.* fixadoras de nitrogênio simbiotes dos nódulos de raízes de árvores leguminosas como a *Leucaena leucocephala* (leucena) podem produzir quantidades elevadas de exopolissacarídeos em meio contendo manitol como fonte de carbono. Santos (2006) também afirma que rizóbios isolados de nódulos de raiz

com características ácidas em meio YMA são bons produtores de muco, o que também foi observado por Barberi et al.(2004).

**Tabela 2.** Reação ao pH e produção de muco de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium spp.* em meio sólido YMA.

	Isolados de nódulos de caule					Isolados de nódulos de raiz				
	51	52	91	101	112	60	61	80	111	113
MUCO	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
pH	ácida	ácida	básica	ácida	neutra	ácida	ácida	ácida	ácida	neutra

Mudanças na produção de polissacarídeos já foram reportadas por Kulkami e Nautiyal (2000), em situações em que o pH, concentração de oxigênio e pressão osmótica estavam fora do padrão ideal para crescimento de espécies do gênero *Rhizobium*.

A produção de exopolissacarídeos também pode estar ligada à sobrevivência desses isolados a fatores ambientais, osmoregulação (SPAINK, 2000) e condições estressantes, uma vez que Tittabutr et al. (2006) observaram expressão de genes específicos em culturas de *Sinorhizobium sp.* (= *Ensifer sp.*) submetidos ao estresse salino.

Analisando a concentração salina, é fato que a salinidade dos solos afeta mais a nodulação que a alcalinidade (SHAMSELDIN & WERNER, 2005). Talvez a combinação de fatores como alta concentração salina e pH alcalino favoreça a eficiência da fixação de nitrogênio realizada por rizóbios adaptados ao ambiente salino. Pois, como afirma Shamseldin e Werner (2005) há correlação positiva entre esses fatores e a atividade da enzima nitrogenase. Os maiores valores encontrados na fixação de nitrogênio tanto para isolados de nódulos de raiz quanto de caule foram realizados por rizóbios que alcalinizam o meio de cultivo (MARTINS et al., 2001).

Em relação ao crescimento em diferentes níveis de pH (Tabela 3), apesar de ter havido diferenças significativas no crescimento dos isolados tanto de caule quanto de raiz, em geral, pode-se considerar que todos os isolados são tolerantes ao pH ácido. Porém, estes isolados necessitam ser testados ainda em simbiose para verificar o mesmo efeito *in vitro*. Chagas Junior et al. (2009) descreveram isolados tolerantes ao pH 4,5 para isolados de solo da Amazônia. Segundo Martins (2010) alta diversidade genética nos isolados de rizóbios tolerantes à pH's baixos pode indicar diferentes mecanismos de resistência a acidez. O pH alcalino prejudicou significativamente o crescimento da maioria dos isolados avaliados, com exceção dos isolados de nódulos de caule, 51 que manteve o crescimento e o isolado 91 que foi favorecido significativamente nesse pH. O isolado 112, manteve o crescimento igual ao pH controle (6,8) quando cultivado no pH alcalino. Para os isolados de nódulos de raiz, apenas o isolado 113 manteve o crescimento nesse pH, todos os demais tiveram seu crescimento reduzido significativamente.

Oliveira e Magalhães (1999) indicam que estirpes tolerantes, principalmente ao pH, em solos da Amazônia, devem ser testadas devido as diferentes condições encontradas nesse ecossistema. Porém de 31 rizóbios, apenas 9 foram tolerantes aos pH's 6,5 e 4,5.

Isolados tolerantes a pH alcalino também são de interesse. Ao contrário do que foi encontrado nesse estudo, Surange (1997) observou que dentre as 17 estirpes isoladas de solos calcareados, todas foram tolerantes ao pH 9 e 3 delas toleraram pH 12.

Apesar da alcalinidade ter sido prejudicial aos isolados desse estudo, a capacidade da bactéria sobreviver e crescer em pH alcalino é de grande importância

especialmente para estudos como associação com plantas em nichos extremamente alcalinos (PADAN et al., 2005).

**Tabela 3.** Médias do crescimento microbiano (D.O.540nm) em meio líquido YM em diferentes níveis de pH.

pH	Isolados de nódulos de caule					Isolados de nódulos de raiz				
	51	52	91	101	112	60	61	80	111	113
6,8	0,393 aA*	0,383 aA	0,262 bC	0,369 aA	0,223 bC	0,358 aA	0,343 aA	0,363 aA	0,338 aA	0,373 aA
3	0,375 aA	0,335 bA	0,315 bB	0,353 aA	0,312 bB	0,406 aA	0,323 cB	0,343 bA	0,305 cB	0,349 bA
9	0,340 aA	0,310 bB	0,314 bB	0,301 bB	0,201 cC	0,317 aB	0,287 bB	0,321 aB	0,294 bB	0,331 aA

\*Médias seguidas de letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Variações à tolerância ao pH para a ordem Rhizobiales já foi observada por diversos autores, essas variações foram de 9,5, 10 (NOUR et al., 1994) até 11 (SHENBAGARATHAI, 1993) dependendo do hospedeiro.

O pH do solo seleciona a população microbiana relacionada com a associação planta-microrganismo. Por esse motivo, apesar da grande quantidade de *Rhizobium etli* ser encontrada nos solos brasileiros, raramente são isolados dos nódulos da raiz do feijoeiro, sendo *Rhizobium tropici* mais comumente encontrado (GRANGE et al., 2007), indicando, portanto, que os isolados desse estudo provavelmente são os mais adaptados às condições ambientais da região do Pantanal.

Segundo Soto et al. (2004) a adição de calcário, em áreas agricultáveis, acaba favorecendo essa associação, mas, em geral nesse estudo, os rizóbios estão adaptados a essa condição ambiental.

Em relação a temperatura, com exceção do isolado 101, todos os demais tiveram crescimento semelhante ou superior quando cultivados a 39 °C(Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias do crescimento microbiano (D.O.) em meio YM em diferentes temperaturas.

T(°C)	Isolados de nódulos de caule					Isolados de nódulos de raiz				
	51	52	91	101	112	60	61	80	111	113
27	0,312 bA	0,256 cB	0,102 eC	0,337 aA	0,193 dB	0,308 aA	0,260 cB	0,223 eB	0,244 dB	0,286 bA
39	0,311 aA	0,315 aA	0,248 cB	0,155 dB	0,205 cB	0,313 bA	0,322 bA	0,273 cA	0,372 aA	0,373 aA

\*Médias seguidas de letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Os resultados deste trabalho estão de acordo com a hipótese de adaptação evolutiva às condições de alagamento proposta pelo autor Saur et al. (1998), pois nesse presente estudo, a temperatura de 39 °C mostrou ser a mais apropriada.

Outra evidência da adaptação desses isolados a altas temperaturas reside no fato observado por Graham e Parker (1964), com 79 isolados de *Rhizobium* do grupo *Medicago* onde apenas 8 foram capazes de crescer à temperatura de 39 °C.

Talvez a adaptação à temperatura possa estar relacionada com a expressão de proteínas do choque térmico que já foram relatadas em diferentes espécies de rizóbios

conferindo controle da temperatura pela inibição da expressão em temperaturas fisiológicas (NOCKER, 2001). Outro trabalho avaliando a expressão dessas proteínas foi realizado por Munchabach (1999), onde foi relatada a presença de pelo menos 12 proteínas em *Bradyrhizobium japonicum* e diversas outras em diferentes espécies de *Rhizobium*.

Fatores abióticos como a temperatura, pH e salinidade interferem positiva ou negativamente no crescimento de bactérias dependendo de seu aparato genético. Apesar do efeito sobre a fisiologia do microrganismo não estar restrito às proteínas (CALDWELL, 2000), são elas as mais afetadas, pois, fora dos valores ótimos podem vir a se desnaturar ou ter seu funcionamento limitado.

Assim, o isolamento de culturas puras pode ser uma ferramenta na pesquisa por rizóbios melhores adaptados às diferentes condições ambientais como afirmado por Surange et al. (1997). Esses fatores constituem limitações para a fixação simbiótica de nitrogênio e a obtenção de estirpes adaptadas pode vir a ser uma alternativa para produção e recomendação de inoculantes.

O comportamento encontrado nos rizóbios noduladores de caule respondem às elevadas temperaturas encontradas na época de inundação do Pantanal. Esse fato sugere que isolados de nódulos de caule estão adaptados às temperaturas mais altas, e que os isolados de raiz apresentam grande potencial de adaptação à temperatura, aspecto relevante para sobrevivência no ambiente pantaneiro.

Maiores estudos fisiológicos são necessários com isolados nativos do Pantanal para contribuir no conhecimento acerca desses microssimbiontes e de suas relações com respectivos hospedeiros, pois só esses estudos poderão elucidar os fatores que mais afetam a competitividade ou a capacidade de formar associações com altas taxas de fixação de nitrogênio.

O papel da planta *Discolobium* não é discutido ou associado aos resultados obtidos.

## CONCLUSÃO

Os isolados de nódulos de caule e de raiz apresentam tolerância à salinidade e à temperatura de 39°C indicando adaptação as condições do Pantanal.

O pH alcalino foi mais prejudicial ao crescimento dos isolados nesse estudo do que o pH ácido, demonstrando adaptação aos solos ácidos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos financiadores das bolsas de estudo, CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. E. R.; SÍGOLO, J. B.; FERNANDES, E.; QUEIROZ NETO, J.P.; BARBIERO, L.; SAKAMOTO, A.Y. Proposta de classificação e gênese das lagoas da baixa Nhecolândia – MS com base em sensoriamento remoto e dados de campo. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, vol.433, n.2, p.83-90, 2003.

BARBERI, A. *et al.* Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v.28, n.2, p.397-405, 2004.

BOIVIN, C. *et al.* Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Critical Review on plant science*. Brewin, v.16, n.2, p.1-30, 1997.

CALDWELL, D. R. **Microbial cell physiology and metabolism**. 2. Ed. Belmont: Star Publishing Company, 2000.403 p.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, vol.39, n.2, p.467 – 470, 2009.

DEHIO, C.; BRUIJN, F. J de. The early nodulin gene SrEnod2 from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant Journal*. Gainesville, v.2, n.21 , p.117, 1992.

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

GRAHAM, P. H.; PARKER C. A. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil*, The Hague, v.20, n.8, p.383–396, 1964.

GRANGE, L. *et al.* New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*., Oxford, v.39, n.4, p.867–876, 2007.

KULKAMI, S.; NAUTIYAL, C. S. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium sp.* NBRI330 Nodulating *Prosopis juliflora*. *Currency Microbiology*., New York, v.40, n.4, p.221–226, 2000.

LADHA, J. K. *et al.* Relative contributions to nitrogenase (acetylene reducing) activity of stem and root nodules in *Sesbania rostrata*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, n.4, p.577-583, 1992.

LOUREIRO, M. F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene spp.* e *Discolobium spp.* nativas do Pantanal Mato-Grossense**. 1994. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

MARTINS, C. M. *et al.* Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v.5, n.5, 2001.

MARTINS, L. M. V. *et al.* Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio. Comunicado técnico, **EMBRAPA**, Brasília, n.19, p.1-14, 1997.

MARTINS, A. F. **Rizóbios, para Lotus spp., resistentes à acidez e à salinidade do solo.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influencia do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, n.5, p.873-883, 2001.

MÚNCHBACH, M *et al.* Multiple small heat shock proteins in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.1, p.83-90, 1999.

NEJIDAT, A. Nitrification and occurrence of salt-tolerant nitrifying bacteria in the Negev desert soils. **FEMS Microbiology Ecology**, London, v.52, n.1, p.21–29, 2005.

NÓBREGA, R. S. A. *et al.* Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência agrotecnica**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 899-905, 2004.

NOCKER, A. *et al.* A mRNA-based thermo sensor controls expression of rhizobial heat shock genes. **Nucleic Acids Res**, Washington, v.20, n.5, p.3538-3543, 2001.

NOUR, S. M. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**., Ottawa, v.40, n.2, p.345–353, 1994.

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, n.10, p.203-208, 1999.

PADAN, E. *et al.* Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. **Biochemistry Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1717, n.23, p.67–88, 2005.



REZENDE FILHO, A. T.; SAKAMOTO, A.Y.; BARBIÉRO, L.; QUEIROZ NETO, J. P.; FURIAN, S. Mapeamento de solos salinos – Pantanal da Nhecolândia, MS: um método cartográfico. In: IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2004, Corumbá-MS. **Anais...** Corumbá:EMBRAPA Pantanal, 2004, 7p.

SANTOS, I. M. da S. **Caracterização morfológica, fisiológica e coleção de cultura de diazotróficos simbióticos associados à cultura da soja sob os sistemas de plantio direto e plantio convencional em Mato Grosso**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2006.

SAUR E. *et al.* Nodulation of *Pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe (Lesser Antilles). **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.14, n.8, p.761–770, 1998.

SHAMSELDIN, A.; WERNER, D. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. **Current Microbiology**, Amsterdam, v.50, n.1, p.11–16, 2005.

SHENBAGRATHAI, R. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium* SBS-R100 symbiotic with *Sesbania procumbens*. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.25, n.10, p.1339–1342, 1993.

SOTO, M.J. *et al.* Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium sp.* LPU83. **FEMS Microbiology Ecology**, London, v.48, n.3, p.71–77, 2004.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Review of Microbiology**, Leiden, v.54, n.9, p.257-288, 2000.

STEGINK S. J.; VAUGHN K.C. Correlation between nodule ultrastructure and ability to produce stem nodules in *Aeschynomene* spp. **Cytologia**, San Francisco, v.53, n.6, p.401–406, 1988.

SURANGE S. *et al.* Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, n.9, p.891–894, 1997.

TITTABUTR, P. *et al.* The alternative sigma factor RpoH2 is required for salt tolerance in *Sinorhizobium sp.* strain BL3. **Res. Microbiol.** São Paulo, v.127, n.7, p.811-818, 2006.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G.; GLENN, A. R. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, n.12, p.1393-1403, 2000.

WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. **Plant Soil**, The Hague, v.171, n.2, p.63-69, 1995.