



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium elkanii*
ESTIRPE BR 29 EM MEIO COM
DIFERENTES VALORES DE pH E
DESEMPENHO DE SUA SIMBIOSE COM
SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL)**

ALEXANDRE BARBERI

2003

ALEXANDRE BARBERI

**CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium elkanii* ESTIRPE BR 29 EM MEIO
COM DIFERENTES VALORES DE pH E DESEMPENHO DE SUA
SIMBIOSE COM SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
área de concentração em Solos e Nutrição de
Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof.^a Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Barberi, Alexandre

Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meio com diferentes valores de pH e desempenho de sua simbiose com soja (*Glycine max* (L.) Merrill) / Alexandre Barberi. -- Lavras : UFLA, 2003.

43 p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Bradyrhizobium elkanii*. 2. Inoculação. 3. Simbiose. 4. Meio de cultura.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.95

-631.46

ALEXANDRE BARBERI

**CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium elkanii* ESTIRPE BR 29 EM MEIO
COM DIFERENTES VALORES DE pH E DESEMPENHO DE SUA
SIMBIOSE COM SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de março de 2003

Prof. Eli Sidney Lopes – BIOSOJA

Prof. Pedro Milanez de Rezende – UFLA



Prof.^a Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais Lia e Renato,
minha irmã Alexandra,
sobrinhos Carol e Luan,
e aos meus avós,

OFEREÇO

A Deus,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida;

Aos meus pais, por todo carinho, apoio e dedicação;

À professora Fátima M. S. Moreira, pela oportunidade oferecida, tempo dispensado, paciência e amizade;

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões; apresentadas para o melhoramento deste trabalho;

A minha namorada Ana, pelo amor, felicidade, carinho e paciência;

Aos meus amigos Juliano, Adriana, Márcio, Lilian e Wal, pelo companheirismo, apoio e carinho;

A Silvana Ap. O. Santos, pelo carinho e incentivo para o ingresso nesta nova fase de minha vida;

A todos os meus colegas, pelos momentos agradáveis que passamos juntos;

A todos os professores do Departamento de Ciências do Solo da UFLA, por todos os ensinamentos;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos;

A todos os funcionários do Departamento de Ciências do Solo da UFLA, por todo apoio.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Inoculantes..... | 3 |
| 2.2 Acidez..... | 4 |
| 2.3 Cálcio..... | 6 |
| 2.4 Hospedeiro..... | 7 |
| 2.5 Soja..... | 9 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 10 |
| 3.1 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS..... | 10 |
| 3.1.1 Influência da pH inicial do meio de cultivo e do cálcio na produção de células de rizóbio. | 10 |
| 3.1.2 Influência do pH inicial e do tamponamento do meio de cultivo na produção de células de rizóbio. | 13 |
| 3.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO..... | 15 |
| 3.2 Desempenho da simbiose soja e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> estirpe Br29 crescida em meio de cultura líquido com três valores de pH inicial (5,5; 6,0 e 6,8) sob condição de solo ácido e com correção de pH. | 15 |
| 3.2.1 Aspectos gerais. | 15 |
| 3.2.2 Instalação e condução do ensaio..... | 17 |
| 3.2.3 Características avaliadas..... | 19 |
| 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 19 |
| 4 RESULTADO E DISCUSSÃO | 19 |

| | |
|---|----|
| 4.1 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS..... | 19 |
| 4.1.1 Influência da pH inicial e do cálcio do meio de cultivo na produção de células de rizóbio. | 19 |
| 4.1.2 Influência do pH inicial e do tamponamento do meio de cultivo na produção de células de rizóbio. | 23 |
| 4.1.2.1 Evolução do pH do meio de cultivo em relação ao tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio igual a 6,8; 6,0 e 5,5. | 23 |
| 4.1.2.2 Evolução do log UFC.mL ⁻¹ em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio igual a 6,8; 6,0 e 5,5. | 24 |
| 4.1.2.3 Evolução da densidade ótica do meio de cultivo em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH inicial do meio de 6,8; 6,0 e 5,5. | 26 |
| 4.2 EXPERIMENTO DE CASA DE VEGETAÇÃO. Respostas de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> estirpe Br29 cultivada em três valores de pH (5,5; 6,0 e 6,8) sob condição de solo ácido na cultura da soja..... | 29 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |
| ANEXOS..... | 42 |

RESUMO

BARBERI, Alexandre. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe Br 29 em meio com diferentes valores de pH e o desempenho de sua simbiose com soja (*Glycine max* (L.) MERRILL). Lavras: UFLA, 2003. 39p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).*

A soja, atualmente é a leguminosa de maior expressão econômica do Brasil. Devido a sua boa lucratividade encontra-se em larga expansão em todo território nacional. Em alguns ensaios em solos ácidos, sob sistema de plantio direto cultivo mínimo no Cerrado, esta cultura tem mostrado baixa a aplicação de calcário. A acidez é um dos fatores que limitam a eficiência da simbiose rizóbio-leguminosas. No entanto, alguns trabalhos mostram a indução de tolerância à acidez quando a bactéria é exposta previamente a um pH levemente ácido. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe Br 29 em meios de cultura com diferentes valores iniciais de pH (6,8; 6,0 e 5,0) e o desempenho de sua simbiose com soja. Foram realizados dois ensaios laboratoriais e um em casa de vegetação. As curvas de crescimento obtidas nos dois ensaios de laboratório variaram de acordo com o pH e com a composição do meio de cultura. O crescimento no meio Lopreto foi melhor em pH 5,5 e no meio Lorda e Balatti em pH 6,0. O crescimento (matéria seca da parte aérea) e nodulação (número e matéria seca) de soja cv. Conquista inoculada com BR 29 em solo ácido (pH 4.9) e sem limitações relacionadas a elementos tóxicos (e.g.: alumínio e manganês), não diferiu com relação ao pH do inoculante. No entanto, todos estes parâmetros foram superiores no tratamento com calagem.

*Comitê Orientador: Prof.^a Dra. Fátima Maria de Souza Moreira (Orientadora).

SECRET

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION
This document contains information that is classified as CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION. It is intended for the use of authorized personnel only. It is to be controlled, stored, transmitted, and disposed of in accordance with the applicable security policies and procedures. It is not to be disseminated, copied, or otherwise made available to unauthorized personnel.

It is the policy of the Department of Defense to ensure that all information that is classified as CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION is properly protected, stored, transmitted, and disposed of in accordance with the applicable security policies and procedures. This document is classified as CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION because it contains information that, if disclosed, could result in the identification, location, or other compromise of the national defense. It is to be controlled, stored, transmitted, and disposed of in accordance with the applicable security policies and procedures. It is not to be disseminated, copied, or otherwise made available to unauthorized personnel.

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

ABSTRACT

BARBERI, Alexandre. Growth of *Bradyrhizobium elkanii* strain Br 29 in culture media with different pH values and performance of its symbiosis with soybean (*Glycine max* (L.) MERRILL). Lavras: UFLA, 2003. 44p. (Master Degree in Soil Science and Plant Nutrition).*

Currently soybean is the most economically important legume crop in Brazil. Due to its profitability soybean is being widely spread out all over the national territory. Some assays have shown low response of this crop to liming in acid Cerrado soil, under no-till systems. Acidity is one of the factors that limits the efficiency of the symbiosis rhizobia – legumes. However, some papers demonstrated induced tolerance to acidity when the bacterium is previously exposed to a slightly acid pH. The aim of this study was to verify the growth of *Bradyrhizobium elkanii* strain Br 29 in culture media with different pH values and the performance of symbiosis with soybean. Two laboratory assays and one in greenhouse were carried out. Growth curves varied either in accordance with pH or culture media composition. Growth was better at pH 5.5 in Lopreto medium and at pH 6.0 at Lorda and Balatti medium. Growth (shoot dry matter) and nodulation (number and dry matter) of soybean cv. Conquista, inoculated with BR 29 in an acid soil (pH 4,9) without limitations regarding toxic elements (e.g.: aluminum and manganese), either without or with lime, showed no differences concerning inoculant pH. However, these parameters were all superior in the liming treatments.

*Guidance committee: Prof.^a Dra. Fátima Maria de Souza Moreira (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) MERRILL) é uma leguminosa domesticada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Sua espécie mais antiga, a soja selvagem, crescia principalmente nas terras baixas e úmidas, junto aos juncos, nas proximidades dos lagos e rios da China Central. Há três mil anos a soja se espalhou pela Ásia, onde começou a ser utilizada como alimento. Foi no início do século XX que passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento das primeiras cultivares comerciais (EMBRAPA, 2002).

No Brasil, o primeiro plantio relatado ocorreu na Bahia, em 1882 (Hasse 1996), mas a soja foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul, em 1914. A sua expansão no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional. Assim, na safra 2001/2002 a área plantada de soja no Brasil foi de 15,840 milhões de hectares, alcançando uma produção de 41,116 milhões de toneladas (CONAB, 2002), colocando o Brasil em segundo lugar no cenário mundial, só sendo superado pelos Estados Unidos, sendo a produtividade média do Brasil superior em mais de cinco sacas.ha⁻¹ à do Estados Unidos(USDA, 2002).

A soja brasileira somente conseguiu chegar a estes patamares graças ao preço competitivo no mercado internacional. Contribuíram para isto os esforços de pesquisadores no melhoramento genético da planta e os avanços das pesquisas em microbiologia do solo, os quais tornaram possível substituir a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, que conseguem suprir a quase totalidade de nitrogênio demandado pela cultura, equivalente a mais de 250 kg de N.ha⁻¹ por cultivo (Urquiaga, Boddey & Neves 1999). Com isso, em cerca de 15,840 milhões de ha

de soja cultivados na safra 2001/2002, o Brasil economizou o equivalente a 1,4 bilhões de dólares.

Para garantir os benefícios proporcionados pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), o agricultor necessita introduzir, no campo de cultivo, estirpes de bactérias eficientes na fixação do nitrogênio e em número adequado, já que no solo podem ocorrer estirpes pouco eficientes ou baixa população de bactérias. Assim, a introdução de uma nova população bacteriana torna-se imprescindível para se alcançar alta eficiência da FBN, a qual é realizada por meio do uso de inoculantes.

No ano de 2001, 99% de todo o inoculante utilizado no Brasil foi produzido para a cultura da soja, sendo 78% deste é uma mistura de turfa e meio cultivado com estirpes de *Bradyrhizobium*. A turfa deve ter seu potencial hidrogeniônico (pH) corrigido e deve ser esterilizada por radiação, apresentando, assim, o inoculante, pH próximo à neutralidade.

Com a introdução da cultura da soja no cerrado brasileiro e com a utilização do plantio direto, alguns pesquisadores, como Caires et al. (1998), Pöttker & Bem(1998), Caires et al. (1999) e Moreira (1999), têm verificado a baixa resposta desta cultura à correção da acidez do solo, alcançando boas produtividades, mesmo em solos naturalmente ácidos.

Com isso, torna-se importante à seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) mais adaptadas a valores de pH mais baixos ou a pré-adaptação das estirpes de BFN já utilizadas nos inoculantes a esta nova faixa de pH. Alguns trabalhos têm demonstrado uma melhor adaptação de bactérias à acidez quando previamente crescidas em meios levemente ácidos, denominando este fenômeno de "acid habituation"(Goodson & Rowbury, 1989 a, b) ou "adaptative tolerance response" (Foster & Hall, 1990, 1991; Dilworth et al., 1999; O'Hara et al., 1989). Estas observações aumentam as questões sobre as

condições de cultivo apropriadas para a preparação de inoculantes para solos ácidos. Pode ser que bactérias crescidas em pH 5,0 tenham maior chance de sobreviver em solos ácidos de que quando crescidas em pH 7,0 (O'Hara & Glenn, 1994).

Em trabalho realizado por Miguel & Moreira (2001), verificou-se maior produção de exopolissacarídeos e de número de unidades formadoras de colônias por mililitro em estirpes de *Bradyrhizobium* (Br 29, Br 4406, SEMIA 587 e INPA 401-11B) crescidas em meio de cultura YMA (Vicent, 1970) com pH inicial igual a 6,0, em comparação com os outros tratamentos (pH inicial 5,0 e 6,8). Não ocorreu diferença entre os tratamentos, pH inicial, na eficiência simbiótica das estirpes testadas em soja. Sendo indicado pelos autores o pH inicial de 6,0; do meio de cultura como boa opção para produção de inoculantes.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento da estirpe Br 29 (= SEMIA 5019 = Br 29w) de *Bradyrhizobium elkanii*, em meios de cultura (Lopreto, 1972 e Lorda & Balatti, 1996) diferindo em relação ao pH inicial (5,5; 6,0 e 6,8), e avaliar o desempenho de sua simbiose com soja em um solo ácido e com correção de pH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inoculantes

Dados do Ministério de Agricultura demonstram que no ano de 2001 foram comercializadas 14 milhões de doses de inoculantes para soja em todo o Brasil, sendo aproximadamente 31% destas foram importadas de outros países, como Argentina e Uruguai. A manutenção e o controle das estirpes dos inoculantes são feitos pela FEPAGRO. De dois em dois anos, representantes da

indústria e pesquisa ligados a esta área, além do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, realizam a reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE), que também tem como objetivo o controle e estabelecimento de normas para a produção e teste destes inoculantes no país.

Na safra 2001/2002, a maior parte dos inoculantes produzidos para soja (52%) foi uma mistura de turfa com pH 6,8 e cultura líquida de duas estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas (SEMIA 587 e SEMIA 5019=BR 29W ou SEMIA 5079 e SEMIA 5080). De acordo com padrões estabelecidos na RELARE (1994), a turfa utilizada deve ser esterilizada para evitar propagação de outros organismos indesejáveis ou que possam afetar a sobrevivência dos *Bradyrhizobium*. O método empregado é o de radiação em virtude do grande volume utilizado. O outro tipo de inoculante apresenta-se na forma líquida, representando 48% da produção total (RELARE 2002), estando ainda a sua composição sob segredo industrial. Todos os inoculantes devem apresentar $1,0 \times 10^8$ células de rizóbio por grama ou mililitro no momento do plantio e não conter nenhum contaminante após diluição de 10^{-5} , além de pH próximo à neutralidade e aproximadamente 40% de umidade. O controle de qualidade é feito por órgãos ligados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2.2 Acidez

Os solos tropicais e subtropicais são normalmente ácidos, seja pela ocorrência de precipitação suficientemente alta para lixiviar quantidades apreciáveis de bases permutáveis do solo, seja pela ausência de minerais primários e secundários, responsáveis pela reposição dessas bases. Sendo assim,

devido a grandes áreas de solos ácidos aráveis, a importância da acidez, sob o aspecto prático, sobrepuja a da alcalinidade em solos tropicais (Custodio et al., 2002).

Segundo Cline & Kaul (1990), a acidez do solo afeta mais a simbiose *Bradyrhizobium* - soja do que a planta hospedeira, pois quando a planta hospedeira recebeu nitrogênio mineral, teve crescimento satisfatório.

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes à FBN em leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação dos nódulos. Seus efeitos podem ser diretos, através da influência sobre a sobrevivência da bactéria, ou indiretos, pela maior ou menor disponibilidade dos elementos úteis (fósforo, cálcio, magnésio e molibdênio) e tóxicos (íons hidrogênio, manganês e alumínio) (Vidor et al., 1983; Graham, 1992). Assim, células crescidas em meio rico com pH próximo ao neutro podem sofrer perda de viabilidade quando adicionadas a solo com pH baixo e desequilíbrio nutricional (Graham, 1992; Clarke et al., 1993; O'Hara & Glenn, 1994 e Dilworth et al., 1999).

O estágio inicial da infecção nodular é o mais afetado por valores baixos de pH, sendo relacionado à reduzida atividade de enzimas responsáveis pela quebra da pectina durante a invasão inicial dos pelos radiculares. O pH crítico, abaixo do qual não haveria nodulação, está na faixa de 3,5 a 5,3, sendo que, para a soja, o valor é de 4,0 (Vidor et al., 1983).

Segundo Vlassak & Vanderleyden (1997), a taxa de nodulação é reduzida em leguminosas cultivadas em solos ácidos, principalmente porque a sensibilidade dos eventos iniciais da nodulação está vinculada ao curvamento dos pêlos radiculares e à iniciação da formação do cordão de infecção. Problemas de expressão dos genes *nod*, os quais são responsáveis pela ativação do processo de nodulação, são mais notados em estirpes sensíveis à acidez do

que em estirpes tolerantes, ao que se pode relacionar o aparecimento de efeitos deletérios relativos à acidez (McKay & Djordjevic, 1993).

Segundo Howieson (1995), a capacidade de algumas estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em manter o pH de seu citoplasma inalterado, mantendo assim suas funções saprofíticas em condições ácidas, além da estabilidade de produtos do gene *nodABC*, polissacarídeos superficiais e proteínas nas mesmas condições, também seriam fatores importantes na tolerância à acidez e manutenção do processo de nodulação. A solução para o manejo de solos ácidos seria a utilização de leguminosas e BFN adaptadas a esta condição (Munns, 1965; Lie, 1971 e Spain et al., 1975).

Resultados obtidos por O'Hara et al. (1989) demonstraram que estirpes de *Rhizobium* tolerantes à acidez podem proporcionar um alto gradiente de pH quando crescidas em condições de elevada acidez, podendo manter a alcalinidade citoplasmática relativamente constante, indicando que a capacidade de tolerar acidez é relacionada com a capacidade de controlar o pH do citoplasma. Confirmando estes resultados, trabalho conduzido por Correa & Barnex (1997) com *Rhizobium loti* demonstram que a tolerância à acidez destas estirpes é um complexo de fenômenos envolvendo mecanismos de constituição da membrana, permeabilidade da membrana exterior e respostas adaptativas ao pH do meio, como a fase de crescimento bacteriano e diferenças na expressão de proteínas.

2.3 Cálcio

O cálcio é importante no processo de infecção dos pêlos radiculares, sendo sua exigência maior na iniciação do nódulo. Sua exigência parece estar ligada à divisão celular nas raízes, necessária para a iniciação do nódulo. Porque

as bactérias necessitam muito menos cálcio que as plantas, o suprimento adequado, do mesmo deve ser fornecido em função das necessidades das plantas (Vidor et al., 1983).

O cálcio é citado em vários trabalhos (Reeve et al., 1993; Hartel & Alexander, 1983; Thornton & Davey, 1983) por desempenhar um papel importante na sobrevivência de rizóbio aos estresses causados pela acidez. Ele está envolvido em muitos processos celulares, como estabilidade da parede celular e complexo peptidoglicano. Segundo Vicent (1962) aproximadamente 25 μM de cálcio em meio líquido já são suficientes para um desenvolvimento normal para *Rhizobium meliloti*; entretanto, sob valores de pH baixo, necessidades de 10 a 100 vezes maiores já foram encontradas (Watkin et al., 1997; Reeve et al., 1993; Howieson et al., 1992). Segundo Aarons & Graham (1991), estirpes de *Rhizobium* tolerantes a valores de pH baixo têm maiores teores de cálcio do que estirpes sensíveis.

Geralmente, a aplicação de calcário em solos ácidos corrige a deficiência de elementos e a toxidez de outros. No entanto, em muitas áreas, a calagem às vezes não é economicamente viável porque são necessárias altas doses de calcário e haveria um alto custo para o seu transporte. Devido a este fato, o desenvolvimento de sistemas adaptados à acidez, pelo uso de estirpes de BFN tolerantes à acidez e plantas hospedeiras tolerantes à acidez, a baixa fertilidade destes solos é uma estratégia favorável (Bordeleau & Prévost, 1994).

2.4 Hospedeiro

De modo geral, o pH rizosférico pode diferir de 1 a 2 unidades em relação ao pH do solo adjacente. Quando a absorção de cátions excede a de ânions, ocorre uma extrusão líquida de H^+ , causando acidez da rizosfera. Por

outro lado, quando ânions são mais absorvidos que cátions, ocorre extrusão líquida de HCO_2^- , com conseqüente elevação do pH (Moreira & Siqueira, 2002).

Em trabalho realizado por Ribeiro Jr., Franco e Lopes (1986 e 1987) em solo ácido, ocorreu um aumento progressivo do pH em direção à raiz de *Enterolobium contortisiliquum* e *Albizia lebbek*, o que pode ser explicado porque estirpes sensíveis à acidez foram capazes de nodular satisfatoriamente esta planta em condição de acidez.

Quando crescem em ambiente ácido, algumas espécies de *Medicago* tolerantes à acidez podem nodular melhor que outras (Howieson et al., 1992) porque mantêm a composição de exsudatos radiculares convenientes para a indução do gene *nod* em *Rhizobium meliloti*, favorecendo a nodulação. A combinação de hospedeiros com habilidade de nodular em solos ácidos e estirpes de rizóbio tolerantes à acidez tem permitido que *Medicago* spp. formem nódulos e persistam em solos com acidez de 4,8 (Ewing & Howieson, 1989). Já em um experimento conduzido por Scholles; Kolling & Freire (1981), a simbiose de *Rhizobium* com siratro, desmódio e soja perene teve alta resposta à aplicação de calcário. Em contrapartida, para lotononis, não houve resposta.

Também é importante salientar que, sob estresse de temperatura foram encontradas diferenças quantitativas e qualitativas de indutores do gene *nod* em exsudatos de raízes de *Cajanus cajan* (L.) Mill sp (Raghuwanshi et al., 1994).

Em *Lupinus angustifolius* e *Lupinus pilosus*, o pH acima de 6,0 é prejudicial à simbiose com *Bradyrhizobium*, sendo que a diminuição do pH para 5,0 estimulou a nodulação e o acúmulo de nitrogênio nas duas espécies (Tang & Robson, 1993). Em pH 4,0, duas espécies de *Cicer arietinum* demonstraram melhor nodulação em relação a outras espécies (Tang & Thomson, 1996).

2.5 Soja

No caso específico da soja, a nodulação parece pouco afetada pela acidez, uma vez que ela pode ocorrer numa faixa de pH de 4,0 a 4,6, desde que existam níveis adequados de nutrientes e que não ocorra toxidez de alumínio e manganês (de Mooy et al., 1973 e Freire, 1976; citados por Marriel, 1984).

Recentes trabalhos têm mostrado respostas pouco expressivas da soja à aplicação de calcário na superfície e altas produtividades da cultura em solos ácidos, sob plantio direto (Caires *et al.*, 1998; Caires et al., 1999, Moreira, 1999 e Pöttker e Ben, 1998). A elevada produção de soja em condições de alta acidez do solo está relacionada à adequada absorção de água e de nutrientes pela cultura, provavelmente em decorrência de maior umidade disponível no solo (Caries & Fonseca, 2000 e Morote *et al.*, 1990). Também tem sido relacionada ao menor efeito tóxico do alumínio, decorrente da formação de complexos orgânicos solúveis presentes nos restos das plantas (Miyazawa et al., 1996), ou ao fato de os teores de cálcio, magnésio e potássio apresentarem disponibilidade suficiente no perfil do solo para manter uma relação adequada com o alumínio (Caires et al., 1998).

Fageria & Baligar (1999), trabalhando com várias espécies cultivadas em casa de vegetação utilizando solos com pH variando de 4,9 a 7,0, notaram que todas as culturas tiveram o peso de matéria seca da parte aérea afetado pelo pH; para a soja, o valor ideal foi de 5,6.

Trabalhos conduzidos por Munns et al. (1977) demonstram diferença na resposta à inoculação de duas variedades de soja expostas a diferentes concentrações de calcário, indicando, assim, a importância do estudo de variedades mais adaptadas ao pH do solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de avaliar o crescimento da estirpe Br 29 em meios com diferentes valores iniciais de pH e de sua simbiose com soja, em solo originalmente ácido, com e sem correção de pH, foram conduzidos dois experimentos laboratoriais no Setor de Microbiologia do Solo e um em casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo da UFLA.

A estirpe Br 29 (= SEMIA 5019 = Br 29w) pertence à espécie *Bradyrhizobium elkanii* e foi isolada na Embrapa Agrobiologia. É utilizada como inoculante desde 1979, sendo considerada competitiva em solos de Cerrado (Peres & Vidor, 1980). Além disso, apresentou o melhor crescimento, em condições de acidez, entre as quatro estirpes testadas por Miguel & Moreira (2001).

3.1 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS:

3.1.1 Influência do pH inicial do meio de cultivo e do cálcio na produção de células de rizóbio

O meio utilizado foi o de Lopreto (1972), adicionado de 1 mL.L⁻¹ de solução de micronutrientes de Zabriskie, citados por Urenha et al. (1994) e cujas composições são ilustradas na Tabela 01. Este foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio. Após autoclavagem dos erlenmeyers a 121 °C por 20 minutos e resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se a inoculação dos mesmos com colônias da estirpe Br 29, que foram obtidas, depois de crescidas, por 7 dias em placa de Petri com meio 79 (Fred & Waksman,

1928), com o auxílio de uma alça de platina. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento, totalizando 16 erlenmeyers.

Os tratamentos testados foram:

1. Meio com pH inicial 5,5 sem cálcio adicional;
2. Meio com pH inicial 5,5 mais 0,5 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio;
3. Meio com pH inicial 6,0 sem cálcio adicional;
4. Meio com pH inicial 6,8 sem cálcio adicional.

O pH do meio foi ajustado para pH 5,5; 6,0 e 6,8 com solução de HCl

2N.

TABELA 01. Composição do meio de cultura e da solução de micronutrientes Zabriskie utilizados no primeiro experimento laboratorial.

| Meio de cultivo | | Solução Zabriskie | |
|--|-------------------------|--|-------------------|
| | g.L ⁻¹ | | g.L ⁻¹ |
| Glicerol | 10 | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,22 |
| Extrato de levedura | 4 | CaCl ₂ | 0,55 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 | MnCl ₂ | 0,50 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 | FeSO ₄ | 0,50 |
| NaCl | 0,1 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O | 0,10 |
| KNO ₃ | 0,8 | CuSO ₄ | 0,16 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,3 | CoCl ₂ | 0,16 |
| MnSO ₄ solução a 10% | 2 gotas.L ⁻¹ | | |
| FeCl ₃ solução a 10% | 2 gotas.L ⁻¹ | | |

Após a inoculação, os erlenmeyers foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital, a 110 rpm e 28°C por 216 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) em placa, pelo método da inoculação de gotas proposto por Miles & Misra (1938).

Para a contagem de UFC.mL⁻¹ foi retirado 1 mL de caldo de cada erlenmeyer, através do uso de pipeta automática desinfetada com álcool a 70%, com ponteira previamente autoclavada. Esta alíquota foi colocada em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,55%), previamente autoclavado, e agitada por 10 segundos em vórtex, originando uma solução com concentração de diluição 10⁻¹. Posteriormente, retirou-se 1 mL da solução 10⁻¹, o qual foi colocado em outro tubo, com 9 mL, seguindo o procedimento citado acima, originando a diluição 10⁻². Este processo foi realizado sucessivamente até a obtenção da diluição 10⁻⁹. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 0,02 mL das diluições 10⁻⁴; 10⁻⁵; 10⁻⁶; 10⁻⁷; 10⁻⁸ e 10⁻⁹, as quais foram colocadas em placas de Petri contendo meio 79 e divididas previamente em seis setores, utilizando-se um setor da placa por diluição. Este procedimento foi realizado em número de três repetições. Após a inoculação e secagem da alíquota, as placas foram colocadas invertidas em uma câmara de crescimento a 28°C pelo período de 7 dias, quando então foi efetuada a contagem das UFC da diluição, que apresentou de 6 a 50 UFC por gota de 0,02 mL (Miles & Misra, 1938). A partir destes números de UFC foram construídas curvas de crescimento em função do tempo. Para a obtenção do tempo de geração dividiu-se um intervalo de tempo específico (T₁-T₂) em horas (fase log) pelo número de gerações. Este foi calculado pelo logaritmo na base 2 da divisão das UFC.mL⁻¹ T₂ pelas UFC.mL⁻¹ T₁.

3.1.2 Influência do pH inicial e do tamponamento do meio de cultivo na produção de células de rizóbio.

O meio utilizado neste experimento teve como base o meio Lorda & Balatti (1996), recomendado em comunicação pessoal pelo pesquisador Luiz Carlos Urenha. Os tratamentos testados foram diferentes quanto aos valores iniciais de pH (5,0, 6,0 e 6,8), tamponados com diferentes proporções de íons fosfato. Todos os três tratamentos receberam as mesmas quantidades de ingredientes apresentados na Tabela 02, só diferindo na proporção de íons de fosfato.

TABELA 02. Composição do meio Lorda & Balatti (1996) modificada.

| Nutrientes | Quantidade (g.L ⁻¹) |
|---|---------------------------------|
| Glicerol | 10 |
| Extrato de levedura | 4 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 |
| NaCl | 0,1 |
| KNO ₃ | 0,8 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,3 |
| MnSO ₄ solução a 10% | 0,06 mL.L ⁻¹ |
| FeCl ₃ solução a 10% | 0,06 mL.L ⁻¹ |

Para o tamponamento desejado foram confeccionadas duas soluções a 8,81 mM de concentração de K₂HPO₄ e KH₂PO₄, colocados na proporção indicada na Tabela 03.

TABELA 03. Volumes de solução a 8.81mM de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 8,81mM, utilizados no meio para obter o pH desejado.

| Sais | pH desejado | | |
|------------|--------------------|-----|-----|
| | 6.8 | 6.0 | 5.5 |
| | mL.L ⁻¹ | | |
| K_2HPO_4 | 55 | 20 | 4 |
| KH_2PO_4 | 45 | 80 | 96 |

Para a padronização do inóculo inicial, uma colônia isolada após crescimento da estirpe por 7 dias em meio 79, foi inoculada em meio Lorda & Balatti (1996) com pH 6,8; ficando sob agitação por seis dias. Em seguida, uma alíquota de 1mL foi inoculada em erlenmeyer de 250mL contendo 149 mL dos respectivos meios, com valores pH ajustado para 5.5, 6.0 e 6.8 com solução de HCl 2N com um número de 4 repetições para cada tratamento, totalizando 12 erlenmeyers.

Após a inoculação, os erlenmeyers foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital, a 110 rpm e 28°C por 168 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL para a contagem de UFC.mL⁻¹, que foi realizada como no experimento anterior. Alíquotas de 5mL foram retiradas para determinação de densidade ótica e do valor de pH. Para a avaliação da densidade ótica foi utilizado um espectrofotômetro marca Hitachi, modelo U-2001 UV/Vis, fazendo leitura de absorbância a 560 nm e utilizando como padrão "0" água destilada. Para leitura de pH, utilizou-se de um potenciômetro de eletrodo combinado previamente calibrado.

3.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

3.2.1 Desempenho da simbiose soja e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe Br29 crescida em meio de cultura líquido com três valores de pH inicial (5.5; 6.0 e 6.8) sob condição de solo ácido e com correção de pH.

Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com fatorial 5x2 e 5 repetições, onde foram utilizadas cinco fontes de nitrogênio (Simbiótica, inoculante com pH 5,5; Simbiótica, inoculante com pH 6,0; Simbiótica, inoculante com pH 6,8; Mineral, 300mg de nitrogênio e Testemunha, sem nitrogênio) e dois níveis de correção de acidez (presente e ausente). A cultivar de soja testada foi a Conquista (MG/BR-46), escolhida por ser uma das mais plantadas no Brasil nas últimas safras. Esta cultivar foi considerada uma das mais sensíveis à acidez entre quatro cultivares testadas por Custódio et al (2002).

3.2.1.1 Aspectos gerais.

A unidade experimental foi constituída por vasos de PVC com capacidade de 1,5 dm³, preenchidos com um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico (Embrapa, 2000), coletado no município de Itumirim-MG, cujas características químicas, antes e depois da calagem, se encontram na Tabela 04. As análises foram realizadas pelos Laboratórios do Departamento de Ciência do Solo da UFLA e interpretação foi feita de acordo com Ribeiro, Guimarães e Alvarez V. (1999).

O solo foi coletado na camada sub superficial (20 a 60 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado em peneira de 4 mm de abertura. O cálculo da calagem foi realizado segundo o método de Saturação por Bases

(Raij, 1981). Nos tratamentos com correção da acidez do solo, esta foi feita de modo a elevar a saturação por base para 70%, utilizando-se carbonato de cálcio PA. Em um vaso, foi adicionado 1.4 dm³ de solo, o que foi posteriormente pesado; com este peso padronizaram-se todas as outras unidades experimentais.

Depois de uma homogeneização, o solo foi umedecido a 60% da capacidade de campo e ficou em repouso 30 por dias.

TABELA 04. Resultados da análise química do solo antes e depois da calagem.

| Elementos | Unidades | Valores | |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------|--------|
| | | antes | depois |
| pH em H ₂ O (1:2,5) | | 4,9 | 6,1 |
| P (Fósforo Mehlich I) | mg.dm ⁻³ | 0,4 | 0,4 |
| K (Potássio Mehlich I) | mg.dm ⁻³ | 23 | 17 |
| Ca | Cmol _c .dm ⁻³ | 0,4 | 1,6 |
| Mg | Cmol _c .dm ⁻³ | 0,2 | 0,4 |
| Al | Cmol _c .dm ⁻³ | 0,1 | 0 |
| H + Al | Cmol _c .dm ⁻³ | 1,5 | 1 |
| S.B. | Cmol _c .dm ⁻³ | 0,7 | 2 |
| t | Cmol _c .dm ⁻³ | 0,8 | 2 |
| T | Cmol _c .dm ⁻³ | 2,2 | 3 |
| m | % | 13 | 0 |
| V | % | 30,6 | 67,1 |
| Matéria Orgânica | dag.kg ⁻¹ | 0,8 | 0,6 |
| Zn | mg.dm ⁻³ | 1,2 | 1,1 |
| Fe | mg.dm ⁻³ | 26,0 | 23,2 |
| Mn | mg.dm ⁻³ | 2,9 | 2,5 |
| Cu | mg.dm ⁻³ | 1,5 | 1,0 |

Método de análise química proposto por Vettori (1969) modificado pela EMBRAPA (1979) e Camargo et al. (1986).

3.2.1.2 Instalação e condução do ensaio

Foram semeadas 5 sementes por vaso, as quais foram desinfectadas superficialmente com etanol 95% por 3 segundos e hipoclorito de sódio por 10 segundos a 1% e posteriormente lavadas com água destilada esterilizada em abundância (comunicação pessoal Dr. José da Cruz Machado Laboratório de Fitopatologia de Sementes / UFLA). Foi realizada a inoculação das sementes com 1 mL, por vaso, de um caldo da estirpe Br 29 com 96 horas de crescimento, de acordo com os procedimentos relatados no experimento anterior, de forma que a população final foi de aproximadamente 7×10^9 células por vaso. Cinco dias após a germinação foi feito o desbaste, deixando uma planta por vaso até 40 dias após germinação, ocasião em que as plantas foram colhidas para avaliação dos parâmetros descritos posteriormente.

No tratamento com adição de nitrogênio mineral, foram realizadas duas adubações com 150mg de N/vaso da fonte NH_4NO_3 , uma após o desbaste e outra 15 dias após a primeira. O solo foi adubado com macro e micronutrientes, conforme descrito na Tabela 05. Não foi utilizada dose "start" de nitrogênio.

TABELA 05. Quantidade de macro e micronutrientes adicionados por vaso contendo 1,4 dm³ de solo.

| Nutrientes | mg.dm ⁻³ de solo | Fonte |
|------------|-----------------------------|---|
| Fósforo | 155 | KH ₂ PO ₄ e H ₃ PO ₄ |
| Potássio | 107 | KH ₂ PO ₄ |
| Cálcio | 40 | CaSO ₄ . 2H ₂ O |
| Magnésio | 82 | MgO |
| Enxofre | 43 | CaSO ₄ . 2H ₂ O |
| Zinco | 5,4 | ZnSO ₄ . 7H ₂ O |
| Ferro | 4,3 | Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O |
| Manganês | 3,8 | MnSO ₄ .H ₂ O |
| Cobre | 1,2 | CuSO ₄ . 5 H ₂ O |
| Boro | 0,86 | H ₃ BO ₃ |
| Molibdênio | 0,16 | NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O |
| Cobalto | 8x10 ⁻⁵ | CoCl ₂ 6H ₂ O |

3.2.1.3 Características avaliadas

Aos 40 dias após a emergência foram avaliados os seguintes parâmetros: matéria seca da parte aérea, número de nódulos/planta, matéria seca de nódulos, matéria seca de raiz, conteúdo de nitrogênio na parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Para a avaliação da matéria seca da parte aérea, as plantas foram cortadas na altura do colo, acondicionadas em sacos de papel e depositadas em estufa de ar forçado (60°C) até a estabilização do peso.

O número de nódulos foi determinado pela contagem dos nódulos depois do seu destacamento manual das raízes previamente lavadas em água corrente. Os nódulos destacados foram colocados em sacos de papel, assim como as raízes

sem os nódulos, e secos em estufa de ar forçado (60°C) até a estabilização do peso, obtendo-se assim, a matéria seca dos nódulos e das raízes.

Para a avaliação do teor de nitrogênio na parte aérea (N%) triturou-se folhas e caules em moinho tipo Wiley, os quais foram passados em peneira de malha 1.0 mm (20 mesh), sendo pesados 100 mg para análise pelo método micro-Kjeldahl. Para o cálculo do acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N), o teor de nitrogênio foi multiplicado pela matéria seca da parte aérea.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados (três ensaios) foram analisados empregando o sistema de análise estatística SISVAR, versão 3.01. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS:

4.1.1 Influência da pH inicial e do cálcio do meio de cultivo na produção de células de rizóbio.

Na Figura 01 estão apresentadas as curvas de crescimento nos meios de cultivo para os quatro tratamentos. Como pode ser observado, todos os tratamentos apresentaram crescimento satisfatório da estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* Br 29 (= SEMIA 5019 = Br 29w), sendo que esta apresentou curvas diferentes para cada meio. Houve significância para os tratamentos, conforme indica a análise de variância (Tabela 1A).

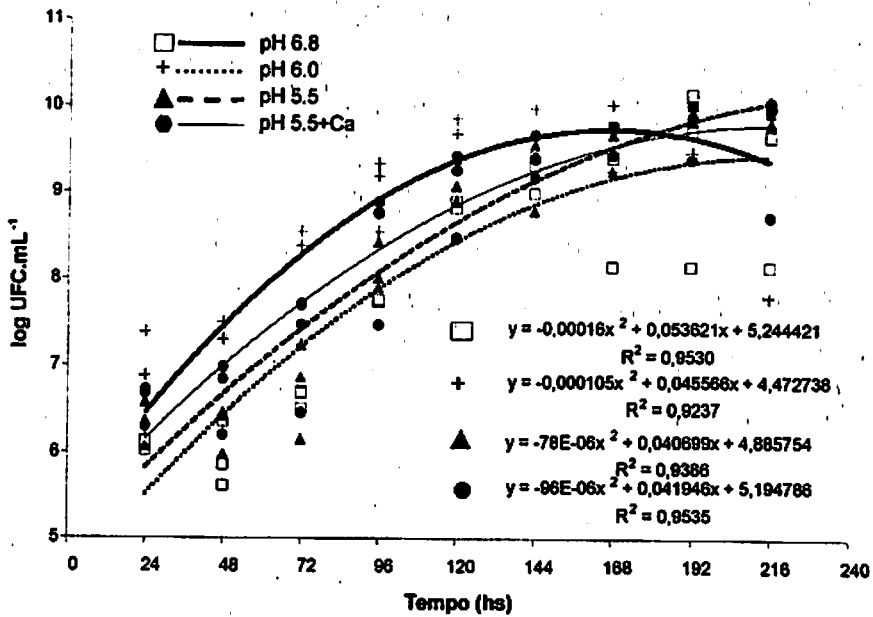


FIGURA 01. Curvas de crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* (Br 29) para os tratamentos com pH inicial do meio 6,8; 6,0; 5,5 e 5,5+Ca.

Na Tabela 06 podem ser vistas as médias do log de UFC.mL⁻¹ em relação ao tempo, comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Só ocorreram diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5% nas datas de leitura de 72 hs e 96 hs. Todavia, não ocorreu significância para o parâmetro tempo de geração no intervalo entre 24 hs e 120 hs, tendo o valor médio do tempo de geração para os quatro tratamentos sido de 10,807 hs. Este valor confirma valores encontrados por Kennedy & Greenwood (1982), citados por Moreira (1991), para tempo de geração de estirpes de crescimento lento, que foram maiores ou iguais a 8,5 hs.


A contagem das primeiras 24 hs mostrou grande amplitude de contagem entre as repetições, sendo que o inóculo inicial não padronização pode ter causado esta diferença, já que algumas repetições podem ter sido inoculadas com maior número de células. Mesmo assim, o inóculo inicial mostrou um número de UFC.mL⁻¹ apreciável, já que não ocorreu uma fase lag em todos tratamentos.

TABELA 06. Médias do log de UFC.mL⁻¹ em relação ao tempo (hs) para os quatro tratamentos de pH inicial do meio com e sem adição suplementar de cálcio.

| Tempo (hs) | Tratamentos | | | | geral |
|---------------|-------------|-------|--------|--------|-------|
| | 6,8 | 6 | 5,5 | 5,5+Ca | |
| 24 | 6,8a | 6,08a | 6,33a | 6,57a | 6,45D |
| 48 | 7,01a | 5,95a | 6,28a | 6,68a | 6,48D |
| 72 | 8,06a | 6,63b | 6,75b | 7,22ab | 7,16C |
| 96 | 9,03a | 7,76b | 8,11ab | 8,38ab | 8,32B |
| 120 | 9,6a | 8,88a | 9,12a | 9,06a | 9,16A |
| 144 | 9,73a | 9,25a | 9,26a | 9,42a | 9,68A |
| 168 | 9,59a | 9,12a | 9,54a | 9,67a | 9,48A |
| 192 | 9,85a | 9,34a | 9,94a | 9,76a | 9,73A |
| 216 | 9,23a | 9,27a | 9,86a | 9,6a | 9,49A |
| geral | 8,76a | 8,03c | 8,36bc | 8,61ab | 8,44 |

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na horizontal, e maiúscula, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A comparação das médias gerais pelo teste de Tukey a 5% revelou que os tratamentos com pH inicial 6,8 e 5,5+Ca foram os que apresentaram o maior



número médio de log de UFC.mL⁻¹ e o tratamento com pH inicial 6,0 foi o que teve o menor número médio de log de UFC.mL⁻¹. Verificou-se um aumento no número médio geral de log de UFC.mL⁻¹ por causa da adição de cálcio ao tratamento com pH inicial de 5,5. Estes resultados confirmam hipóteses sugeridas por Vicent (1962) e confirmadas por Watkin, O'Hara & Glenn (1997); Reeve et al. (1993); Howieson et al. (1992), segundo os quais o aumento da disponibilidade de cálcio no meio de cultivo possibilitaria melhor crescimento de estirpes de rizóbio em pHs mais baixos.

A partir das equações das curvas de crescimento foi obtido o número máximo de UFC.mL⁻¹, encontrando-se, para os tratamentos com pH inicial 5,5 e 5,5+Ca, valores iguais, pelo teste de Tukey a 5%, respectivamente de $1,5 \times 10^{10}$ e $6,0 \times 10^9$. Pelo mesmo teste, não houve diferença entre os tratamentos 6,8; 6,0 e 5,5+Ca, que obtiveram valores máximos de número de UFC.mL⁻¹ iguais a $5,5 \times 10^9$, $2,6 \times 10^9$ e $6,0 \times 10^9$, respectivamente.

A diferença entre o melhor valor de pH obtido pela comparação de médias em tempos específicos (Tabela 06) e o melhor valor de pH pela comparação dos números máximos de UFC pode ser explicada pelo fato dos melhores valores de pH no segundo caso (5,5 e 5,5+Ca) terem sido obtidos em tempos além do intervalo de tempo das determinações do primeiro caso (Tabela 06).

Como o objetivo é obter o maior número possível de UFC através da correção do pH a indicação destes valores através do cálculo do número máximo é o mais adequado.

4.1.2 Influência do pH inicial e do tamponamento do meio de cultivo na produção de células de rizóbio.

4.1.2.1 Evolução do pH do meio de cultivo em relação ao tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio iguais a 6,8; 6,0 e 5,5.

Ocorreu significância estatística tanto dos tratamentos quanto do tempo e interação entre eles pela análise de variância ($\alpha = 0,01$) (Tabela 2A). Verificou-se um aumento progressivo do pH do meio em decorrência da multiplicação das células ao longo do tempo (Figura 02), sendo mais acentuado nos tratamentos com pH inicial do meio com valores de 5,5 e 6,0; confirmando resultados obtidos por Ribeiro Jr. et al. (1987), entretanto, após 72 hs não havia mais diferença estatística entre o pH dos tratamentos. Assim, possíveis efeitos do pH do meio só devem ter influenciado no crescimento da população bacteriana até 72 hs. Vários pesquisadores (Gemell & Roughley, 1993; Bromfield & Jones, 1980; Howieson et al., 1992) encontraram baixa correlação entre estirpes tolerantes a pH ácido em meio de cultivo e tolerância à acidez do solo. Estes resultados poderiam ser explicados pela facilidade de alteração do pH do meio, devido ao seu baixo poder tampão em relação à grande concentração de UFC.mL^{-1} existente no meio. Em contrapartida, no solo, e também na rizosfera, o poder tampão é bem maior e o número de UFC.g^{-1} bem menor; assim, a capacidade de alteração do meio poderia ser de menor importância do que outros mecanismos adotados pelos microorganismos para se protegerem dos efeitos maléficos do íon hidrogênio e outros íons presentes quando este estiver em altas concentrações.

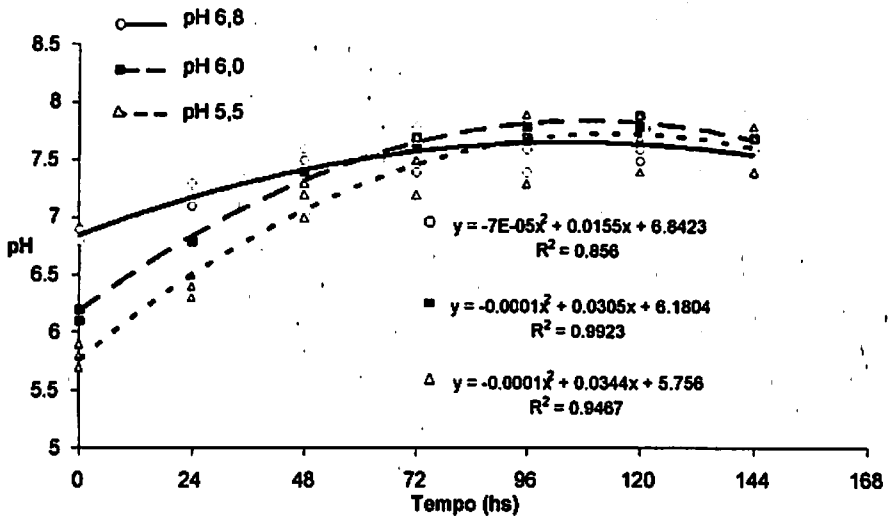


FIGURA 02. Evolução do pH do meio de cultivo em relação ao tempo para os três tratamentos com pH inicial do meio igual a 6,8; 6,0 e 5,5.

4.1.2.2 Evolução do $\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio igual a 6,8; 6,0 e 5,5.

Em função da padronização do inóculo inicial, verificou-se uma diminuição da amplitude dos dados (Figura 03). Verificou-se, também, uma diminuição do coeficiente de variação (Tabela 3A), o qual, em comparação com o do primeiro experimento, diminuiu em mais de 9 vezes.

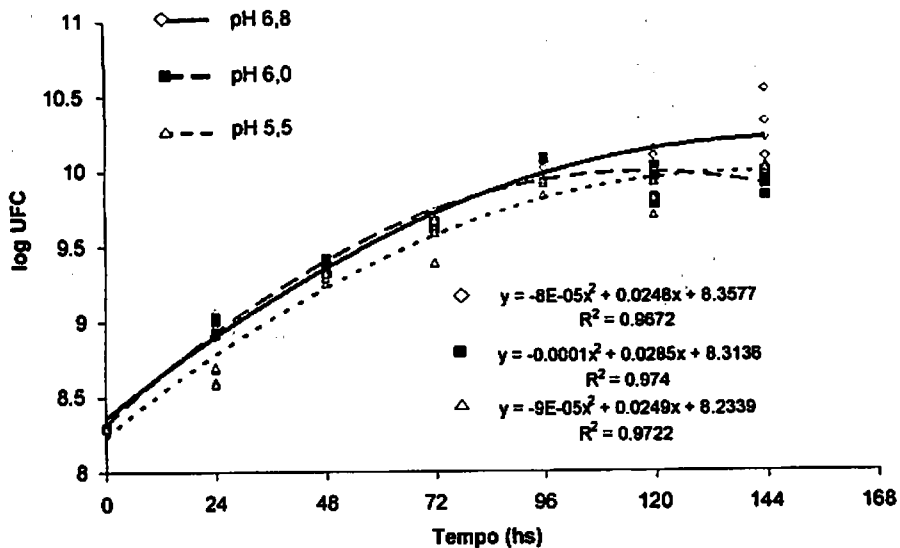


FIGURA 03. Curvas de crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* (Br 29) para os tratamentos com pH inicial do meio tamponado 6,8; 6,0 e 5,5.

Tanto os tratamentos como o tempo e a interação destes fatores foram significativos pela análise de variância ($\alpha = 0,01$). Também foram significativas pela análise de variância ($\alpha = 0,01$) as diferenças do tempo de geração entre os tratamentos no intervalo de 0 hs e 96 hs, havendo um aumento do tempo de geração para o tratamento com pH inicial de 5,5, que foi de 18,081 hs, sendo que, para os tratamentos com pH inicial de 6,8 e 6,0, os tempos de geração foram de 16,577 hs e 16,321 hs, respectivamente, não diferindo entre si pelo teste de Tukey a 5%. Este valor confirma resultados encontrados por Kennedy & Greenwood (1982), citados por Moreira (1991), para estirpes de crescimento lento. Não ocorreu fase lag em nenhum dos tratamentos.

Para todos os tempos, os tratamentos com pH inicial 6,8 e 6,0 estiveram sempre entre os melhores (Tabela 07), diferindo de resultados obtidos por Miguel & Moreira (2001), que em meio YMA (Vincent, 1970) obtiveram crescimento melhor em pH inicial igual a 6,0. Isso talvez tenha ocorrido pelo aumento do tempo de geração dos outros tratamentos, como verificado em trabalho de Watkin, O'Hara & Glenn (1997). Todos os tratamentos atingiram números de UFC.mL⁻¹ superiores aos encontrados por e Miguel & Moreira (2001), que foram aproximadamente 10⁹. Isto é explicado pela melhor utilização da fonte de carbono do meio Lorda & Balatti (1996) que na composição possui glicerol em comparação com o manitol utilizado no meio YMA (Vicent, 1970) que foi testado por estes autores.

TABELA 07. Médias do log de UFC.mL⁻¹ em relação ao tempo (hs) para os três tratamentos, pH inicial do meio tamponado 6,8; 6,0 e 5,5.

| Tempo (hs) | Tratamentos | | | geral |
|---------------|-------------|--------|-------------------|--------|
| | 6,8 | 6,0 | 5,5 | |
| 0 | 8,30a | 8,30a | 8,30 ^a | 8,30F |
| 24 | 8,99a | 8,97a | 8,64b | 8,87E |
| 48 | 9,66a | 9,64a | 9,56a | 9,35D |
| 72 | 9,37a | 9,39a | 9,28a | 9,62C |
| 96 | 10,05a | 10,08a | 9,91b | 10,01A |
| 120 | 9,99a | 9,89ab | 9,84b | 9,91B |
| 144 | 10,29a | 9,92b | 10,00b | 10,07A |
| geral | 9,52a | 9,45b | 9,36c | 9,45 |

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na vertical, e maiúscula, na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A partir das equações das curvas de crescimento foi obtido o número máximo de UFC.mL⁻¹ para cada tratamento, verificando-se que o tratamento com pH inicial 6,0 obteve o maior número máximo, 2,18x10¹⁰ UFC.mL⁻¹ seguido pelo tratamento com pH inicial de 6,8; 1,9x10¹⁰ UFC.mL⁻¹, e pelo tratamento com pH inicial 5,5, que obteve o menor número máximo, 9,1x10⁹ UFC.mL⁻¹, os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5%. Estes valores confirmam resultados obtidos por Miguel & Moreira (2001), que também obtiveram maiores números máximos de UFC.mL⁻¹ no tratamento com pH igual a 6,0; no entanto, o tempo para atingir o crescimento máximo para os tratamentos com pH inicial 6,8; 6,0 e 5,5 foram 155, 142,5 e 138,3 hs, respectivamente, diferindo dos resultados obtidos por Miguel & Moreira (2001), que encontraram respectivamente 165, 143 e 159. Isto pode ser explicado pela diferença na composição dos meio, principalmente pela fonte de carbono e pelo fato de o número de células inoculadas ter sido maior.

4.1.2.3 Evolução da densidade ótica do meio de cultivo em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH inicial do meio de 6,8; 6,0 e 5,5.

Ocorreu significância estatística tanto dos tratamentos quanto do tempo e interação entre eles pela análise de variância ($\alpha = 0,01$) (Tabela 4A).

Verificou-se correlação entre log UFC.mL⁻¹ e densidade ótica, encontrando um valor de 80,94% de correlação para os três tratamentos (Figura 04).

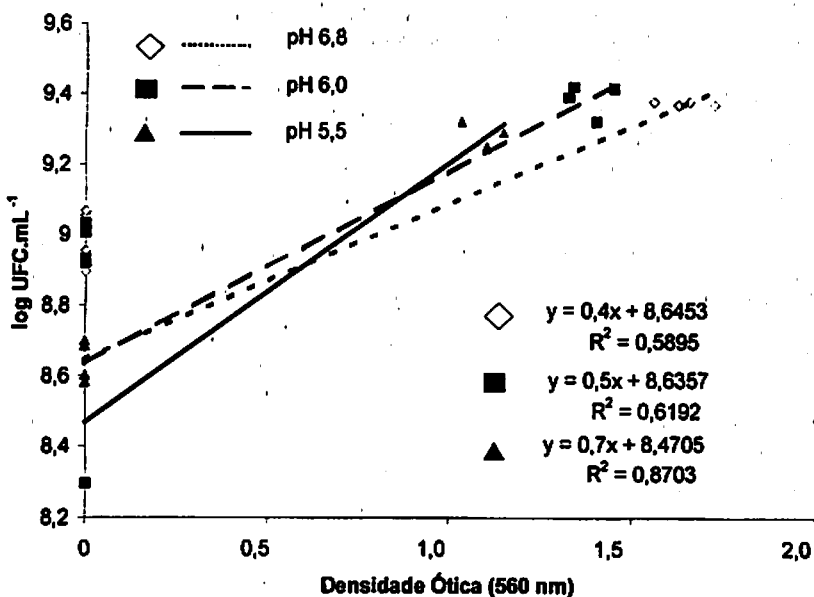


FIGURA 04. Evolução da densidade ótica em relação ao $\log \text{UFC.mL}^{-1}$ para os três tratamentos com pH inicial do meio igual a 6,8; 6,0 e 5,5,

A densidade ótica expressa o número de células somado aos exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelas mesmas. A produção de EPS é uma resposta de várias espécies de bactérias a uma gama de fatores limitantes; EPS pode ter um papel integral em permitir que um organismo sobreviva sob uma variedade de circunstâncias estressantes (Cunningham & Munns, 1984).

Para avaliar a produção de EPS, tomou-se um número base de $10^{8,8}$ UFC.mL^{-1} para que, com este, pudéssemos comparar as diferenças na densidade ótica nos três tratamentos. Com isso, verificou-se que nesta concentração de UFC, as densidades óticas dos tratamentos com pH inicial 6,8; 6,0 e 5,0 foram,

respectivamente, 0,386, 0,328 e 0,470. Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Miguel & Moreira (2001), que em outro meio de cultura (YMA) obtiveram maior densidade ótica para o tratamento com pH igual a 6,0, utilizando o mesmo número base ($10^{8,8}$ UFC. mL⁻¹), mas confirmam resultados de Cunningham & Munns (1984), que obtiveram maior quantidade de EPS em estirpes de *Rhizobium* tolerantes à acidez do meio, quando expostas a meio ácido.

4.2 EXPERIMENTO DE CASA DE VEGETAÇÃO:

Respostas de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe Br29 cultivada em três valores de pH (5,5; 6,0 e 6,8) sob condição de solo ácido na cultura da soja.

Verificou-se significância estatística para os tratamentos fonte de nitrogênio e calagem. Só ocorreu significância na interação fonte de nitrogênio com calagem para o parâmetro porcentagem de nitrogênio na parte aérea. O resumo da análise de variância encontra-se no Tabela 5A.

Para os parâmetros número de nódulos e matéria seca de nódulos, os melhores tratamentos foram os inoculados, não diferindo entre si, sendo seguidos pela testemunha e pelo tratamento com adubação mineral com nitrogênio (300 mg/vaso) (Tabela 08). O parâmetro matéria seca de nódulos mostrou-se bem superior aos obtidos por Miguel & Moreira (2001) e Lima (1995) no tratamento testemunha sem nitrogênio, sugerindo a ocorrência de alta população de *Bradyrhizobium* spp. nativos.

TABELA 08. Quadro de médias para os parâmetros número de nódulos (nº nod) e matéria seca de nódulos (nod).

| tratamentos | nº nod | nod |
|----------------------------|---------|--------|
| Fonte de nitrogênio | | |
| | uni | mg |
| 0 N | 110,72b | 398b |
| pH 5,5 | 230,64a | 586a |
| pH 6,0 | 209,25a | 555a |
| pH 6,8 | 192,21a | 558a |
| 300 N | 13,36c | 67c |
| Calagem | | |
| com | 156,75a | 0,521a |
| sem | 112,21b | 0,345b |

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si para cada parâmetro pelo teste de Tukey a 5%.

Para os parâmetros matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e acúmulo de nitrogênio na parte aérea, o melhor tratamento foi o adubado com nitrogênio de forma mineral (300 mg/vaso)(Tabela 09.); os demais tratamentos não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. Resultados semelhantes foram obtidos em vaso por Oliveira et al. (1991).

TABELA 09. Quadro de médias para os parâmetros matéria seca parte aérea (parte aérea); matéria seca raiz (raiz) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N).

| tratamentos | parte aérea | raiz | N |
|----------------------------|-------------|-------|--------|
| Fonte de nitrogênio | | | |
| | g | g | mg |
| 0 N | 3,51b | 1,43b | 87,9b |
| pH 5,5 | 4,21b | 1,37b | 112,8b |
| pH 6,0 | 4,00b | 1,42b | 124,5b |
| pH 6,8 | 3,82b | 1,42b | 108,9b |
| 300 N | 6,71a | 2,29a | 224,8a |
| Calagem | | | |
| com | 4,99a | 1,68a | 144,4a |
| sem | 3,91b | 1,49b | 119,2b |

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si para cada parâmetro pelo teste de Tukey a 5%.

Para todos os parâmetros, excetuando o parâmetro percentagem de nitrogênio, os tratamentos com calagem foram superiores aos sem calagem, confirmando resultados obtidos por Munns et al., (1977); Scholles et al. (1981) e Cline & Kaul (1990)(Tabelas 08 e 09).

O parâmetro porcentagem de nitrogênio foi o único que apresentou significância para a interação fonte de nitrogênio e calagem, sendo que, no tratamento com N mineral, não houve diferença entre os tratamentos com e sem calagem, nos demais tratamentos de fonte de nitrogênio, os tratamentos com calagem foram superiores aos sem calagem (Tabela 10).

TABELA 10. Quadro de médias da interação tipos de nitrogênio e calagem para o parâmetro porcentagem de nitrogênio na parte aérea.

| Tratamentos | Sem calagem | Com calagem |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| 0 N | 2,41b | 2,59a |
| pH 5,5 | 2,67b | 2,70a |
| pH 6,0 | 2,67b | 3,36a |
| pH 6,8 | 2,68b | 3,09a |
| 300 N | 4,05a | 2,88a |

Médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem entre si para cada parâmetro pelo teste de Tukey a 5%.

5. CONCLUSÕES

1. O pH inicial do meio influenciou o crescimento da estirpe estudada; porém, as respostas a estes tratamentos variaram de acordo com o meio de cultura utilizado;
2. No meio Lorda & Balatti o melhor pH foi 6,0 e no meio Lopreto o melhor pH foi 5,5;
3. Não houve diferença no desenvolvimento das plantas de soja entre os tratamentos que receberam os inóculos produzidos com meios que tinham pH 5,5, 6,0 e 6,8;
4. A calagem proporcionou maior desenvolvimento da planta e da nodulação;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONS, S. R.; GRANHAM, P. H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*, The Hague, v. 134, n. 2, p. 145-151, July 1991.

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*, The Hague, v. 161, n. 1, p. 115-125, Apr. 1994.

BROMFIELD, E. S. P.; JONES, D. G. Studies on acid Tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture and soil. *Journal Applied Bacteriology*, Washington, v. 48, n. 3, p. 243-264, Mar. 1980.

CAIRES, E. F.; CHUEIRI, W. A.; MADRUGA, E. F.; FIGUEIREDO, A. Alterações de características químicas do solo e resposta da soja ao calcário e gesso aplicados na superfície em sistema de cultivo sem preparo do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 27-34, jan./mar. 1998.

CAIRES, E. F.; FONSECA, A. F. Absorção de nutrientes pela soja cultivada no sistema de plantio direto em função da calagem na superfície. *Bragantia*, Campinas, v. 59, n. 2, p. 213-220, 2000.

CAIRES, E. F.; FONSECA A. F.; MENDES, J.; CHUEIRI, W. A.; MADRUGA, E. F. Produção de milho, trigo e soja em função das alterações das características químicas do solo pela aplicação de calcário e gesso na superfície, em sistema de plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 315-327, abr./jun. 1999.

CAMARGO, O. A.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. *Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas*. Campinas: IAC, 1986. 94 p.

CLARKE, L. M.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Survival of *Rhizobium meliloti* culture: effect of combined pH shock and carbon substrate stress. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1289-1291, Sept. 1993.

CLINE, G. R.; KAUL, K. Inhibitory effects of acidified soil on the soybean/*Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 127, n. 2, p. 243-249, Oct. 1990.

CONAB, 2002. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em:

CORREA, O. S.; BARNEX, A. J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 13, n. 2, p. 153-157, Mar. 1997.

CUNNINGHAM, S. D.; MUNNS, D. N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminum activity. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v. 48, n. 6, p. 1276-1280, Nov./Dec. 1984.

CUSTODIO, C. C.; BOMFIM, D. C.; SATURNINO, S. M.; MACHADO NETO, N. B. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 145-153, jan./mar. 2002.

DILWORTH, M. J.; RYNNE, F. G.; CASTELLI, VIVAS-MARFISI, A. I.; GLENN, A. R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, Reading, v. 145, n. 7, p. 1585-1593, July 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Brasília. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cinco.htm>. Acesso em: 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos e análises de solos**. Rio de Janeiro, 1979. 79 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 2000. 412 p.

EWING, M. A.; HOWIESON, J. G. The development of *Medicago polymorpha* L. as an important pasture species for southern Australia. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 16., 1989. **Proceedings...** Nice, France, 1989. p. 197-198.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Growth and nutrient concentrations of common bean, lowland rice, corn, soybean and wheat at different soil pH on an

Inceptisol. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 9, p. 1495-1507, 1999.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 2, p. 771-778, Feb. 1990.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *S. typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 16, p. 5129-5135, Aug. 1991.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

GEMELL, L. G.; ROUGHLEY, R. J. Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1447-1452, Oct. 1993.

GOODSON, M.; ROWBURY, R. J. Habituation to normally lethal acidity by prior growth *Escherichia coli* at a sub lethal acid pH value. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 77-79, 1989a.

GOODSON, M.; ROWBURY, R. J. Resistance of acid-habituating *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 211-214, 1989b.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 475-484, June 1992.

HARTEL, P. G.; ALEXANDER, M. Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminum-rich soils. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 47, n. 3, p. 502-506, May/June 1983.

HASSE, G. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre: L&PM, 1996. 256 p.

HOWIESON, J. G. Rhizobial persistence and its role in the development of sustainable agricultural systems in Mediterranean environments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n.4/5, p. 603-610, Apr./May 1995.

HOWIESON, J. G.; ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. **Australian Journal Plant Physiology**, Murdoch, v. 19, n. 3, p. 287-296, 1992.

LIE, T. A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. **Plant and Soil**, The Hague, p. 117-127, 1971. (Special Volume)

LIMA, S. C. Dinâmica da nodulação, caracterização de *Bradyrhizobium japonicum* e produção de soja a campo. Piracicaba, 1995. 75 p.

LORDA, G. S.; BALATTI, A. P. Designing média I. In: BALLATI, A. P.; FREIRE, J. R. J.; Legume inoculants. Selection and Characterization of strains. Production, use and management. 1996

MARRIEL, I. E. Efeitos de fatores limitantes sobre o crescimento de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan e de soja (*Glycine max* (L.) MERRILL). Vicosá, 1984. 114 p.

McKAY, I. A. , and DJORDJEVIC, M. A. Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 10, p. 3385-3392, Oct. 1993.

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. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimations of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; SANTOS, J. C. F. Effects of addition of crop residues on the leaching of Ca and Mg in Oxisols. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT-SOIL INTERACTIONS AT LOW pH, 4., 1996,

Belo Horizonte. Abstracts... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/EMBRAPA-CPAC, 1996. p. 8.

MOREIRA, F. M. S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosas introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. 160 p. Tese (Doutorado em Solos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Itajaí.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, Lavras: UFLA, 2002. p. 399-471.

MOREIRA, S. G. Calagem em sistema de semeadura direta e efeitos sobre a acidez do solo, disponibilidade de nutrientes e produção de soja. Piracicaba, 1999. 87 p.

MOROTE, C. G. B.; VIDOR, C.; MENDES, N. G.; PEREIRA, J. S. Melhoria da nodulação de soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 14, n. 2, p. 143-150, abr./ago. 1990.

MUNNS, D. N. Soil acidity and growth of a legume. In: Interactions of lime with nitrogen and phosphate on growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v. 16, n. 5, p. 733-741, 1965

MUNNS, D. N.; FOX, R. L.; KOCH, B. L. Influence of lime on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. *Plant and Soil*, The Hague, v. 46, n. 3, p. 591-601, 1977.

O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, New York, v. 161, n. 4, p. 286-292, Apr. 1989.

O'HARA, G. W.; GOSS, T. J.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v. 55, n. 8, p. 1870-1876, Aug. 1989.

OLIVEIRA, J. C.; RAMOS, M. L. G.; DUQUE, F. F. Inoculação de soja, em solo de cerrado, no primeiro ano de cultivo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 15, n. 3, p. 273-276, set./dez. 1991.

PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v. 4, n. 2, p. 139-143, maio/ago. 1980.

PÖTTKER, D.; BEN, J. R. Calagem para uma rotação de culturas no sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 675-684, out./dez. 1998.

RAGHUWANSHI, A.; DUDEJA, S. S.; KHURANA, A. L. Effect of temperatura on flavonoid production in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp) in relation to nodulation. *Biology Fertility of Soils*, Berlin, v. 17, n. 4, p. 314-316, Apr. 1994.

RAIJ, B. VAN. Avaliação da fertilidade do solo. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato (EUA)/Instituto Internacional da Potassa, 1981. 142 p.

REEVE, W. G.; TIWARI, R. P.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 25, n. 5, p. 581-586, May 1993.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA – RELARE, 6., 1994, Londrina. Ata... Londrina: IAPAR/EMBRAPA Solo, 1994.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA – RELARE, 9., 2002, São Paulo. Ata... Londrina: Material distribuído: IPT, 2002.

RIBEIRO Jr., W. Q.; FRANCO, A. A.; LOPES, E. S. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp., para *Enterolobium contortisiliquum*, em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v. 10, n. 2, p. 219-225, maio/ago. 1986.

RIBEIRO Jr., W. Q.; FRANCO, A. A.; LOPES, E. S. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. , para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia Lebbek* em latossolo ácido. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v. 11, n. 2, p. 275-282, maio/ago. 1987.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T.; ALVAREZ V, V. H. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª Aproximação. Viçosa, MG, 1999. 359 p.

SCHOLLES, D.; KOLLING, J.; FREIRE, J. R. J. Necessidade de inoculação e aplicação de calcário em leguminosas forrageiras tropicais em solos ácidos. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Campinas, v. 5, n. 2, p. 97-102, maio/ago. 1981.

SPAIN, J. M.; FRANCIS, C. A.; HOWELER, R. M.; CALVO, F. Differential species and varietal tolerance to soil acidity in tropical crops and pastures. In: BORNEMISSA, E.; ALVARADO, A. *Soil management in tropical America*. Cali: CIAT, 1975. p. 308-347.

TANG, C.; ROBSON, A. D. pH above 6. 0 reduces nodulation in *Lupinus* species. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 152, n. 2, p. 269-276, May.

TANG, C.; THOMSON, B. D. Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legume species. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 186, n. 2, p. 321-330, Oct. 1993.

THORNTON, F. C.; DAVEY, C. B. Acid tolerance of *Rhizobium* in culture média. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v. 47, n. 3, p. 496-501, May/June 1983.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p.

URQUIAGA, S.; BODDEY R. M.; NEVES, M. C. P. A necessidade de uma revolução mais verde. FERTBIO 1999 INTERRELAÇÃO, 1999, Lavras – MG. *Anais...* Lavras: UFLA, 1999.

USDA. 2002. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em:

VETTORI, L. **Métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24 p. (Boletim Técnico, 7).

VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J. R. J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M. H. T. **Fixação Biológica do Nitrogênio pela Simbiose entre *Rhizobium* e Leguminosas**. IPAGRO, 1983. 51 p. (Boletim Técnico, 11).

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root nodule bacteria**. London: JBP, 164p. 1970.

VINCENT, J. M. Influence of calcio and magnesium on the growth of *Rhizobium*. **Journal General Microbiology**, London, v. 28, n. 4, p. 653-663, 1962.

VLASSAK, K. M.; VANDERLEYDEN, J. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 16, n. 2, p. 163-229, 1997.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. Calcium and acid estress interact to effect the growth of *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 9/10, p. 1427-1432, Sept./Oct. 1997.

ANEXOS

| Anexo A | Página |
|--|---------------|
| TABELA 1A. Resumo da análise de variância para log de UFC.mL ⁻¹ em relação ao tempo (hs) para os quatro tratamentos, pH inicial do meio igual a 6.8, 6.0, 5.5 e 5.5+Ca..... | 42 |
| TABELA 2A. Resumo da análise de variância para variável pH do meio de cultivo em relação ao tempo..... | 42 |
| TABELA 3A. Resumo da análise de variância para variável log UFC.mL ⁻¹ em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio igual a 6.8; 6.0 e 5.5..... | 42 |
| TABELA 4A. Resumo da análise de variância para variável densidade ótica do meio de cultivo em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH inicial do meio de 6.8; 6.0 e 5.5..... | 43 |
| TABELA 5A. Resumo do quadro de análise de variância para os parâmetros matéria seca parte aérea (parte aérea); matéria seca raiz (raiz); percentagem de nitrogênio na parte aérea (% N); número de nódulos (n° nod); matéria seca de nódulos (nod) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N)..... | 43 |

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para log de UFC.mL⁻¹ em relação ao tempo (hs) para os quatro tratamentos, pH inicial do meio igual a 6.8, 6.0, 5.5 e 5.5+Ca.

| FV | GL | Fc |
|------------|------|---------------------|
| TRAT | 3 | 7.642 ** |
| TEMPO | 8 | 63.713** |
| TRAT*TEMPO | 24 | 0.778 ^{ns} |
| CV (%) | 7.5% | |

** significante ($\alpha = 0.01$)

^{ns} não significante

TABELA 2A. Resumo da análise de variância para variável pH do meio de cultivo em relação ao tempo.

| FV | GL | Fc |
|------------|------|-----------|
| TRAT | 2 | 40.721** |
| TEMPO | 6 | 231.671** |
| TRAT*TEMPO | 12 | 13.471** |
| CV (%) | 1.73 | |

** significante ($\alpha = 0.01$)

TABELA 3A. Resumo da análise de variância para variável log UFC.mL⁻¹ em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH iniciais de meio igual a 6.8; 6.0 e 5.5.

| FV | GL | Fc |
|------------|------|-----------|
| TRAT | 2 | 30.388** |
| TEMPO | 6 | 869.275** |
| TRAT*TEMPO | 12 | 5.695** |
| CV (%) | 0.82 | |

** significante ($\alpha = 0.01$)

TABELA 4A. Resumo da análise de variância para variável densidade ótica do meio de cultivo em decorrência do tempo para os três tratamentos com pH inicial do meio de 6.8; 6.0 e 5.5.

| FV | GL | Fc |
|------------|------|-------------|
| TRAT | 2 | 91.092** |
| TEMPO | 6 | 47408.725** |
| TRAT*TEMPO | 12 | 85.038** |
| CV (%) | 1.19 | |

** significante ($\alpha = 0.01$)

TABELA 5A. Resumo do quadro de análise de variância para os parâmetros matéria seca parte aérea (parte aérea); matéria seca raiz (raiz); percentagem de nitrogênio na parte aérea (% N); número de nódulos (n° nod); matéria seca de nódulos (nod) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N).

| FV | GL | F. calculado | | | | | |
|----------|----|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | parte aérea | raiz | % N | n° nod ^(a) | nod | N |
| Fonte N | 4 | 14.269** | 15.404** | 5.668** | 43.533** | 40.225** | 20.79** |
| Calagem | 1 | 12.263** | 4.596* | 0.048 ^{ns} | 9.013** | 32.820** | 5.710* |
| Tipo*Cal | 4 | 0.364 ^{ns} | 1.305 ^{ns} | 5.345** | 2.506 ^{ns} | 0.356 ^{ns} | 1.438 ^{ns} |
| CV (%) | | 24.28 | 19.95 | 16.77 | 19.46 | 25.00 | 28.23 |

** significante ($\alpha = 0.01$)

* significante ($\alpha = 0.05$)

^{ns} não significante

^(a)valores transformados para $(n+1)^{0,5}$