

SOBREVIVÊNCIA DO *BRADYRHIZOBIUM* EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS ESTERILIZADOS¹

MÁRCIA DO VALE BARRETO FIGUEIREDO², NEWTON PEREIRA STAMFORD³,
HÉLIO ALMEIDA BURITY⁴ e CAIO VIDOR⁵

RESUMO - Foi determinada a sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. (*Clitoria*) em substratos alternativos submetidos a duas formas de esterilização. Os substratos diatomita, pó-de-coco, vermiculita, vinhaça seca e composto urbano foram comparados com o substrato convencional (turfa), usando-se a estirpe UMKL 58 (Malásia (NIFTAL)). A avaliação das células viáveis de *Bradyrhizobium* sp. foi feita nos diferentes materiais utilizados, através dos métodos de diluição em placas e infecção em plantas (cunhã - *Clitoria ternatea* L.). O efeito da esterilização por autoclavagem e radiação gama (5Mrad) foi avaliado em intervalos de 0, 12, 30, 60 e 90 dias. A turfa irradiada mostrou melhor crescimento e sobrevivência da bactéria, sendo o desempenho consistente em relação aos dois métodos de avaliação. A sobrevivência da bactéria no substrato diatomita foi comparável à turfa, como também, o seu efeito na nodulação e crescimento das plantas. Os demais veículos apresentaram resultados inferiores, embora com possibilidades de serem usados como substratos alternativos.

Termos para indexação: *Clitoria ternatea*, esterilização, inoculante, fixação do N₂.

SURVIVAL OF *BRADYRHIZOBIUM* IN STERILIZED ALTERNATIVE INOCULANT CARRIERS

ABSTRACT - A determination was made of the survival of *Bradyrhizobium* sp. (*Clitoria*) in alternative substrates submitted to two forms of sterilization. Substrates composed of diatomaceous material, coconut powder fiber, vermiculite, vinasse and urban compost waste were compared with the conventional substrate (turf), using the strain UMKL 58 (Malaysia NIFTAL). The evaluation of the viable *Bradyrhizobium* sp. cells was made on the different materials utilized by means of the dilution in plates or plant infection method (cunhã-*Clitoria ternatea* L.). The effect of sterilization by autoclaving and gamma radiation (5Mrad) was evaluated at intervals of 0, 12, 30, 60 and 90 days. The irradiated turf showed a better growth and survival of the bacteria, with a consistent performance in relating the two evaluation methods. The survival of the bacteria in the diatomaceous substrate was comparable to that of turf as was its effect on nodulation and plant growth. The other carriers presented inferior results, although showing possibilities of being used as alternative substrates.

Index terms: *Clitoria ternatea*, sterilization, inoculant, nitrogen fixation.

¹ Aceito para publicação em 11 de março de 1991.

² Bióloga, M.Sc., Dep. de Microbiol. do Solo, Empresa de Pesquisas Agropecuárias do Estado de Alagoas S/A - EPEAL, CEP 57060 Maceió, AL.

³ Eng. - Agr., Dr., Prof. - Adj., Dep. de Agron. UFRPE, CEP 52061 Recife, PE. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias - IPA (EMBRAPA), CEP 50000 Recife, PE. Bolsista do CNPq.

⁵ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. - Adj., Dep. de Solos, UFRGS, CEP 91500 Porto Alegre, RS.

INTRODUÇÃO

A densidade populacional do *Rhizobium* e/ou *Bradyrhizobium* no inoculante pode ser afetada pelo tipo de tratamento a que o substrato é submetido antes de sua utilização como veículo na elaboração do inoculante. No Brasil, a produção industrial de inoculantes é feita utilizando a turfa finamente moída. Outros materiais têm sido avaliados, porém a turfa

vem apresentando melhores resultados (Roughley & Vincent 1967). Vantagens adicionais são: a sua longa sobrevivência em armazenagem, a facilidade de fabricação em veículo esterilizado ou não esterilizado e a facilidade de manuseio.

Segundo Smith (1987) e Gonzalez et al. (1986), outros veículos vêm sendo pesquisados como alternativa à turfa, tais como: carvão vegetal, carvão mineral, bagaço, palha de milho, casca de arroz e algodão, minerais como apatita e outros. Entretanto as vantagens e desvantagens de diversos materiais para veículos transportadores têm sido revistas por Date & Roughley (1977), Burton (1979), Paczkowski & Berryhill (1979), Hiltbold et al. (1980) e Skipper et al. (1980). Estes autores relatam que diferenças entre estirpes, número de rizóbio viável e tipo de veículo podem contribuir para largas variações na eficiência dos inoculantes.

A sobrevivência da bactéria depende das características químicas, físicas e biológicas, e de outros fatores tais como condições de umidade e suficiente troca de gases, temperatura de armazenagem, forma de esterilização, e da própria estirpe utilizada (Vincent 1980).

A esterilização pode preservar um alto número de bactérias viáveis, diminuindo os efeitos antagônicos de outros microrganismos que competem com as estirpes do inoculante (Wu & Kuo 1969). Muitos experimentos mostram que a esterilização da turfa é benéfica para a multiplicação inicial do rizóbio e para sobrevivência durante a estocagem. Existem também evidências de que certas estirpes de rizóbio, de crescimento lento, possam sobreviver pobremente numa turfa não esterilizada, como também poucas dúvidas de que, em geral, um veículo livre de contaminantes é superior a um não-esterilizado (Roughley & Vincent 1967). Assim, este é um ponto importante a ser considerado na produção de inoculantes, como também tem sido demonstrado que para condições de armazenagem em câmaras frias (4°C), a turfa esterilizada não apresenta decréscimo acentuado do número inicial de bactérias, mesmo quando utilizado um longo

período de armazenagem (Roughley & Vincent 1967). No entanto essas informações foram obtidas, na maioria dos casos, para bactérias de crescimento rápido, havendo poucas informações relacionadas com as de crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

O presente trabalho foi conduzido para verificar a sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. (*Clitoria*), em substratos alternativos submetidos a diferentes formas de esterilização.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa, foram avaliados cinco veículos alternativos para possível substituição da turfa na produção de inoculante para leguminosas. As origens dos substratos usados são: Diatomida (Carro Quebrado-RN); Composto Urbano (aterro sanitário curado da usina de tratamento de lixo da cidade do Recife); Vinhaça Seca (Usina Estreliana, Ribeirão-PE); Vermiculita (Eucatex S/A - São Paulo); Pó-de-Coco (PLANALSUCAR, Carpina-PE) e Turfa (EMBRAPA/CNPBS - Km 47, Rio de Janeiro).

Estes materiais foram secados ao ar e passados em peneira de 200 mesh (0,074 mm), e efetuada a análise física - segundo a metodologia seguida pela EMBRAPA (EMBRAPA 1979) - e química, de acordo com a metodologia do Ministério da Agricultura (Brasil 1983) (Tabelas 1 e 2).

O pH dos diferentes materiais foi corrigido para 6,8 a 7,0 através da adição de carbonato de cálcio para os substratos ácidos, e de ácido clórico para os alcalinos. A umidade usada foi correspondente ao potencial matricial de -0,33 bar, em decorrência da diferença de retenção de água dos substratos utilizados e dos problemas de mortalidade advindos da perda de umidade.

No preparo do inoculante os diferentes substratos foram acondicionados em sacos de polipropileno (0,05 mm), com 40 g de material por pacote de inoculante. Após o fechamento dos pacotes procedeu-se às esterilizações, por autoclavagem a 125°C, por uma hora, com intervalos de 24 horas, durante três dias consecutivos, totalizando três horas de esterilização; e por irradiação (radiação gama-5MRad), feita com bomba de cobalto (⁶⁰Co), tipo Gammacel, pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, usando uma taxa de exposição de 0,00916MR/h, com um total de 5MRad por amostra.

TABELA 1. Análise física dos substratos usados e seus respectivos potenciais matriciais (ψ_m).

Substrato	ψ_m (bar)								Análise física		
	-0,10	-0,33	-0,50	-1,00	-3,00	-5,00	-10,00	-15,00	Ur ⁺	dr ⁺⁺	da ⁺⁺⁺
	----- g/g -----								- g/g -	----- g/cm ³ -----	
Pó-de-coco	2,93	1,31	1,22	0,98	0,81	0,78	0,74	0,70	0,19	1,22	0,81
Turfa	1,91	1,08	0,82	0,76	0,67	0,65	0,62	0,57	0,16	1,49	0,49
Diatomita	1,61	1,50	1,40	1,15	0,68	0,41	0,35	0,31	0,07	1,80	0,32
Vermiculita	1,20	1,09	0,82	0,55	0,35	0,27	0,23	0,18	0,07	2,23	0,59
Vinhaça seca	0,73	0,60	0,51	0,43	0,28	0,25	0,23	0,21	0,06	2,07	0,91
Comp. urbano	0,58	0,54	0,41	0,35	0,24	0,18	0,16	0,15	0,04	2,26	1,11

Ur⁺ = Umidade residual
 dr⁺⁺ = Densidade real
 da⁺⁺⁺ = Densidade aparente

TABELA 2. Análise química dos substratos.

Amostra	Análise química										
	pH (H ₂ O)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	M.O.	Cinza	C	CE	
	- 1:10 -	----- % -----								----- mS/cm -----	
Pó-de-coco	5,4	0,68	0,66	1,78	1,68	2,22	59,48	25,80	34,50	4,60	
Turfa	4,8	1,54	0,10	0,08	4,89	1,61	70,00	15,93	40,71	0,81	
Diatomita	4,3	0,49	0,66	0,04	0,45	0,54	18,99	76,03	11,01	0,12	
Vermiculita	9,1	0,68	0,08	0,39	16,27	4,63	3,90	87,67	2,26	0,19	
Vinhaça seca	6,8	1,20	0,82	0,36	0,84	1,61	25,86	69,88	22,34	1,17	
Comp. urbano	7,2	0,49	0,62	0,11	3,37	1,01	15,49	79,72	8,98	0,21	

Foi usada a estirpe de *Bradyrhizobium* sp., isolada de *Clitoria ternatea*, originária da Malásia, base NIFTAL, cedida pelo IPAGRO-Seção de Microbiologia do Solo-MIRCEN, Porto Alegre-RS, catalogada sob o n° 6053 SEMIA. A bactéria foi transferida de meio sólido inclinado, para meio líquido com manitol e extrato de levedura-YEM (Fred & Waksman 1928), incubando-se em agitador rotativo a 28°C por sete dias. Após este período o caldo apresentou 10⁹ células bacterianas por cm³, avaliadas por contagem direta em câmara de Petroff-Hauser e por diluição em placas. O volume do caldo a acrescentar foi uniforme para todos os substratos, baseando-se no potencial matricial (ψ_m -0,33bar), indicado pelo composto urbano, que foi o que apresentou menor retenção de umidade. A complementação foi feita com meio YEM, de acordo com a retenção de cada substrato, sendo o caldo e o meio injetados assepticamente através de uma seringa hipodérmica esterilizada (Roughley & Vincent 1967). Imediatamente após a injeção fez-se a limpeza com álcool, no local da perfuração, e em seguida foi feita a vedação com fita adesiva esterilizada.

O conteúdo de cada pacote foi homogeneizado com manipulações vigorosas, e a seguir, as amostras foram colocadas em maturação a 28°C (Roughley 1970 e Date 1976); após doze dias foram armazenadas a 5°C.

Foram efetuadas contagens em placas, nos períodos de 0, 12, 30, 60 e 90 dias após a adição do inóculo, sendo cada pacote usado uma única vez. Para contagem em placas usou-se o meio YEMA com vermelho congo, sendo adicionado após a autoclavagem, contendo 50 ppm de ciclohexamida, esterilizada por filtração através de membrana com poros de 0,45 μ m de diâmetro (Millipore Corporation, Bedford, Massachussets).

As diluições e infecções em plantas seguiram a metodologia descrita por Vincent (1970), sendo efetuadas no período de 30 dias em câmara de crescimento, utilizando como planta-teste a *Clitoria ternatea* L. (cunhã), cujas sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (Zaroug & Munns 1980)

A seguir, foi instalado em casa-de-vegetação um experimento em vasos-de-Leonard esterilizados

(Leonard 1944), três meses após a incubação dos pacotes inoculados. O inoculante foi preparado com 10 g do inóculo de cada pacote, misturado com 50 ml de solução salina (25% de sais do meio 79), e mantido em agitação durante 15 minutos. Foram plantadas duas sementes pré-germinadas por vaso, e a inoculação foi feita por adição de 5 ml do inóculo por vaso. Foi adicionada uma dose de arranque com nitrogênio, equivalente a 20 ppm de N, sete dias após a germinação, e em seguida adicionou-se solução nutritiva isenta de nitrogênio (Norris 1964). As plantas receberam água previamente fervida, sempre que necessário, após a adição de um litro de solução nutritiva por vaso.

Nos tratamentos incluíram-se duas testemunhas sem inoculação, sendo uma com adubação nitrogenada (100 ppm de N) e outra sem adição de nitrogênio. Foi usado o esquema fatorial 5x2, com o delineamento em blocos ao acaso, com dois fatores (substrato e esterilização) e quatro repetições, nas diluições, e contagem em placas inteiramente casualizadas com duas repetições e oito sub-amostragens. Foram calculados índices de correlação, bem como feita a análise de regressão do tipo linear simples, para se obter informações sobre o grau de associação entre o método NMP e o método em placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esterilização por irradiação (radiação gama) proporcionou maior número de células

viáveis por grama de inoculante durante todo o período de condução do experimento, atingindo uma população de 10^9 (Fig. 1). O processo de esterilização por autoclavagem apresentou uma população de 10^8 células por grama de inoculante no final do período de incubação. A sobrevivência da bactéria, nos dois tratamentos de esterilização, aumentou da terceira para a quarta amostragem, com um pequeno acréscimo na quinta determinação, sendo considerado o ponto ideal para o número de células viáveis/NCV. Trabalhos conduzidos por Smith (1987), Date & Roughley (1977) e Roughley & Vincent (1967) demonstraram que a esterilização a 121°C , por quatro horas, ou a 125°C por três horas, pode tornar a turfa menos favorável ao crescimento do rizóbio do que a irradiação gama a uma dose de 5MRad, provavelmente devido aos efeitos indesejáveis do aquecimento. Portanto, muita atenção deve ser dirigida ao método de esterilização, como também ao uso de veículos que tenham sido apenas parcialmente esterilizados pela aplicação restrita de aquecimento.

Vincent (1980) relatou excelente sobrevivência de rizóbio em turfa esterilizada por radiação gama (5MRad), e este método é comumente usado para todos os inoculantes produzidos na Austrália.

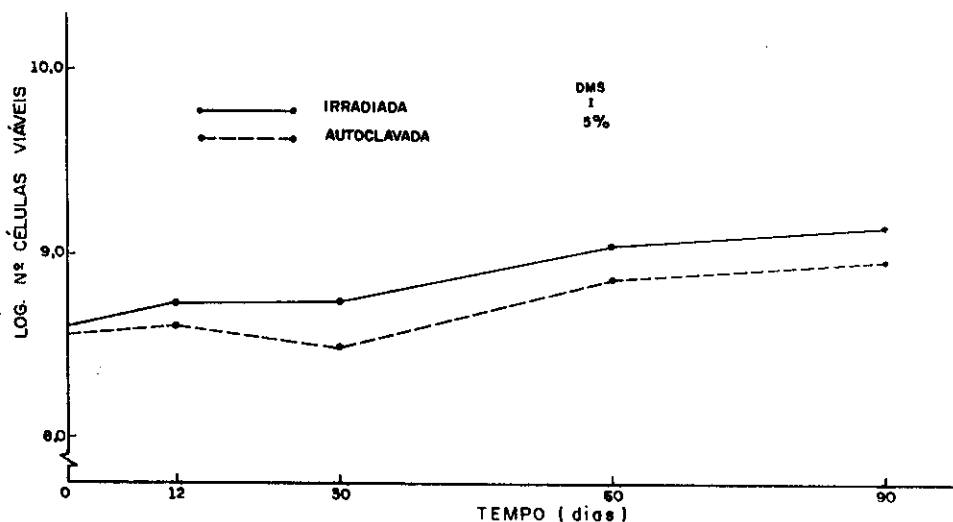


FIG. 1. Efeito da esterilização na sobrevivência de *Bradyrhizobium* sp. em diferentes intervalos de tempo.

Foi observado que em alguns casos a irradiação não esterilizou completamente os substratos, pois em algumas placas ocorreu o surgimento de contaminantes identificados como *Aspergillus* e *Gliocadium*, porém em número muito baixo, não interferindo no crescimento e identificação das colônias de *Bradyrhizobium*. No substrato pó-de-coco foi registrado maior número de contaminantes, mostrando que certos materiais podem favorecer o crescimento de determinados microrganismos que sejam resistentes a esta dose de radiação.

Estudando os intervalos de tempo em relação aos substratos alternativos (Fig. 2), observou-se que ocorreu uma diminuição no NCV para os veículos pó-de-coco e vermiculita; entretanto, nas avaliações posteriores obtve-se aproximadamente os mesmos valores alcançados. No período de 30 a 60 dias, houve aumento no NVC para todos os veículos, continuando o crescimento de 60 a 90 dias, com exceção da vinhaça e do composto urbano que praticamente permaneceram numa fase estacionária.

Pode ser verificado na Tabela 3 que para todos os substratos usados como veículo de inoculação, a diatomita e a turfa foram consideradas superiores aos demais tratamentos nos diferentes intervalos de tempo. Isto demonstra

que as características dos materiais, com suas propriedades físicas, químicas e biológicas próprias, podem propiciar maior longevidade da bactéria introduzida e assegurar alto NCV em relação aos períodos de incubação.

A Fig. 3 mostra a avaliação da população bacteriana dos diferentes veículos, pelos métodos de diluição e infecção em plantas, e pelo

TABELA 3. Interação entre substratos e processos de esterilização na sobrevivência de *Bradyrhizobium*¹.

Substrato	Processo de esterilização	
	Irradiação	Autoclavagem
Turfa	9,05 a	9,00 a
Diatomita	9,11 a	9,04 a
Vinhaça seca	8,92 b	8,74 b
Composto urbano	8,82 c	8,66 c
Vermiculita	8,66 d	8,44 d
Pó-de-coco	8,56 e	8,34 e

CV (%) = 0,70

¹ Log do número de bactérias/g de inoculante.

² Na coluna, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

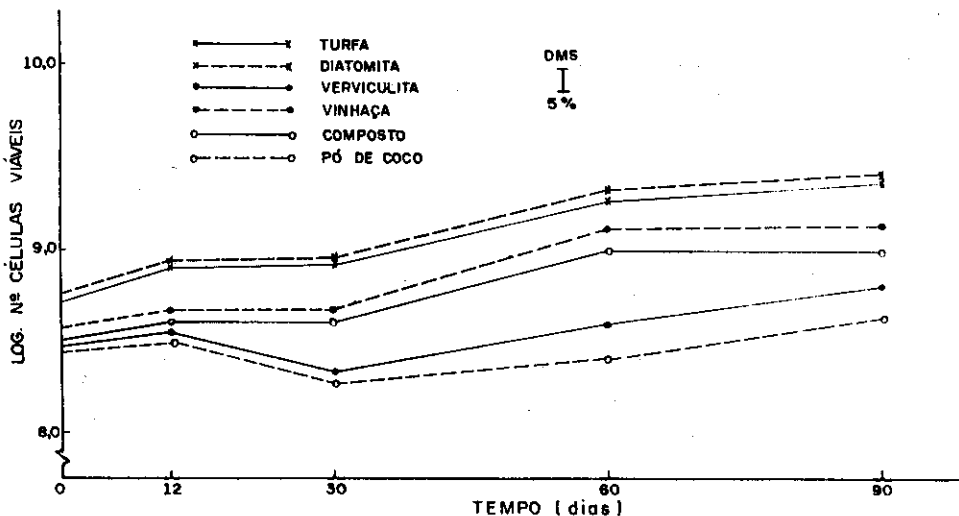


FIG. 2. Efeito do tempo na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos alternativos, em função da esterilização.

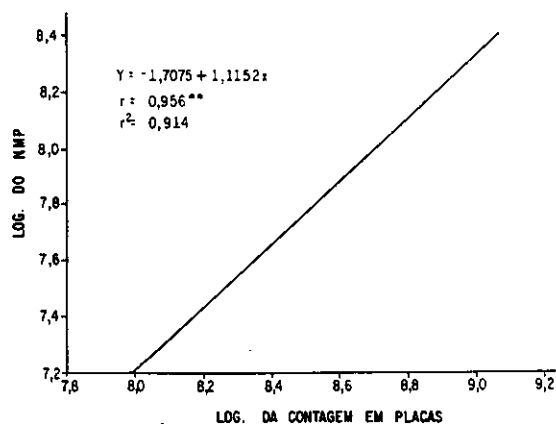


FIG. 3. Correlação de número mais provável-NMP (Y) e contagem em placas (X) na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos, em função da esterilização, armazenados por 30 dias.

método da diluição e contagem em placas, apresentando um coeficiente de correlação ($r = 0,956$) altamente significativo. Os resultados obtidos pelo método de infecção em plantas foram sempre inferiores aos encontrados em placas, contudo, dentro do limite de confiabilidade de 95%. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Hiltbold et al. (1980), que encontraram para o método de infecção em plantas, a mesma tendência observada.

A avaliação do inoculante quanto à sua eficiência para produzir nódulos e fixar N_2 após a estocagem (Tabelas 4 e 5), favoreceu o sistema de esterilização por radiação gama em todos os parâmetros estudados, concordando com Strijon & Vanrensbur, citados por Smith (1987). Os substratos irradiados apresentaram superioridade, tendo a vantagem de serem mais uniformes e de aumentarem a viabilidade da bactéria. Vincent (1980) constatou que a armazenagem é, com certeza, um fator primordial. Porém, é necessário conhecer a estirpe e o sistema de esterilização a serem utilizados.

A esterilização por autoclavagem, apesar de apresentar resultados inferiores, não comprometeu a eficiência da estirpe. Porém, a eficiência de nutrientes adicionados ou dos contidos nos materiais usados como vesículos, po-

TABELA 4. Nodulação e produção de matéria seca da cunhã cultivada em vasos-de-Leonard, em função do processo de esterilização nos diferentes substratos.

Tratamento	Nodulação		Matéria seca da parte aérea
	Número	Peso da matéria seca	
	n ^o /vaso	g/vaso	g/vaso
Turfa	28,0 b	0,22 ab	2,70 a
Diatomita	34,0 a	0,24 a	2,68 a
Vermiculita	19,0 cd	0,19 b	2,29 b
Vinhaça seca	17,0 d	0,13 c	2,22 b
Composto urbano	22,0 c	0,20 ab	2,03 c
Pó-de-coco	20,0 cd	0,12 c	1,82 d
Esterilização			
Por irradiação	26,0 a	0,23 a	2,29 a
Por autoclavagem	21,0 b	0,14 b	2,11 b
Fatorial x adicionais			
Fatorial	24,0 a	0,18 a	2,29 a
Adicionais	0 b	0 b	1,72 b
Entre adicionais			
Testemunha com N	0	0	2,84 a
Testemunha sem N	0	0	0,65 b
CV (%)	8,01	18,65	3,13

Na coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 5. Nitrogênio total acumulado na parte aérea da cunhã cultivada em vasos-de-Leonard, em função da esterilização dos substratos¹.

Substrato	Processo de esterilização	
	Irradiação	Autoclavagem
Turfa	88,73 aA	69,58 aB
Diatomita	89,35 aA	68,53 aB
Vermiculita	68,13 bA	52,50 bB
Vinhaça seca	63,58 cA	50,45 bB
Composto urbano	59,32 dA	46,40 cB
Pó-de-coco	45,66 eA	32,75 dB
CV (%) = 3,89		

¹ Na coluna (minúsculas), e na horizontal (maiúsculas), as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

de decrescer ou aumentar, com o efeito da autoclavagem (Wu & Kuo 1969), podendo interferir no processo de infecção.

Em relação ao efeito dos veículos sobre nodulação e crescimento das plantas, foram constatadas diferenças em todos os parâmetros avaliados, favorecendo a diatomita e a turfa como substratos de inoculação para leguminosas. Foi observado, também, o efeito da eficiência fixadora da estirpe nestes veículos. O nitrogênio proveniente da simbiose foi suficiente para prover as necessidades das plantas, dependendo do substrato inoculado.

A regressão entre o N total acumulado na parte aérea e o peso de nódulos apresentou um coeficiente de correlação ($r = 0,781$), indicando que o nitrogênio fixado, na maioria dos casos, está na dependência do tecido nodular formado, o que está de acordo com Döbereiner et al. (1966).

CONCLUSÕES

1. Os dois métodos de esterilização foram efetivos, porém na radiação gama houve maior sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp.

2. A diatomita e a turfa como veículos de inoculação, para leguminosas, foram considerados superiores, e o pó-de-coco foi o material menos indicado por apresentar menor efeito no crescimento das plantas.

3. As sobrevivências das bactérias diferiram entre si, em relação aos substratos usados, quando medidas através da infecção em planta e da contagem em placas, que se mostraram métodos consistentes e com boa correlação.

4. O passo mais importante para preparação de inoculantes em materiais parcialmente esterilizados é a adição de grande quantidade de inóculo. Porém, em alguns casos pode acarretar problemas com actinomicetes, que são mais resistentes e com alto grau de antibiose.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. **Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes: métodos oficiais.** [S.l.:s.n.], 1983. 103p.
- BURTON, J.C. *Rhizobium* species. In: PEPPLER, H.J.; PERLMAN, D. **Microbial Technology.** 2.ed. New York: Academic Press, 1979. v.1, p.29-57.
- DATE, R.A. Legume inoculant production. **Proceedings of the Indian National Science Academy, Section B,** Bangalore, v.40, n.6, p.667-686, 1976.
- DATE, R.A.; ROUGHLEY, R.J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, W.F.; GIBSON, A.H. **A treatise on dinitrogen fixation.** New York: Wiley, 1977. p.243-276.
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. de; PEN-TEADO, A. de F. Avaliação da fixação de nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso dos nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Rio de Janeiro, v.1, p.233-237, 1966.
- EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de Análise do Solo.** Rio de Janeiro, 1979. v.1.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S. **Laboratory manual of general microbiology.** New York: McGraw Hill Book Company Inc., 1928.
- GONZALEZ, N.M.; AYUNDA, A. de; GOMEZ, M.; GONZALEZ, Z.R. Evolución de algunos materiales de soporte para inoculantes bacterianos. **Turrialba,** San José, v.36, n.1, p.447-452, 1986.
- HILTBOLD, D.A.E.; THURLON, D.L.; SKIPPER, H.D. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. **Agronomy Journal,** Madison, v.72, p.675-681, 1980.
- LEONARD, L.T. **Methods of testing legumes bacteria cultures and results of tests of commercial inoculants.** Washington: United States Department of Agriculture, 1944. p.1-8 (USDA, Circular, 708).
- NORRIS, D.A. Technique used in work with *Rhizobium*. In: Some concepts and methods in subtropical pasture research. Farnham Royal: Commom. Agriculture Bur., 1964. p.186-189.
- PACZKOWSKI, N.W.; BERRYHILL, D.L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal based legume inoculants. **Applied Environment Microbiology,** Washington, v.38, p.612-615, 1979.

- ROUGHLEY, R.J. The preparation and use of legume seed inoculants. **Plant and Soil**, The Hague, v.32, p.675-701, 1970.
- ROUGHLEY, R.J.; VINCENT, J.M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. **Journal Applied Bacteriology**, London, v.30, n.2, p.362-376, 1967.
- SKIPPER, H.D.; PALMER, J.H.; GIDDENS, J.E.; WOODRUFF, J.M. Evaluation of Commercial soybean inoculants for south Caroline and Georgia. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.673-674, 1980.
- SMITH, R.S. Production and quality control of inoculants. In: ELKAN, C.H. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker, 1987. p.392-411.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwells Scientific Publications, 1970. 164p.
- VINCENT, J.M. Factors controlling the legume *Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W.E.; ORME-JOHNSON, W.H. **Nitrogen fixation**. Baltimore: [s.n.], 1980. v.2, p.103-129.
- WU, M.M.H.; KUO, R.C. Influence of autoclaved compost carrier of rhizobia for legume inoculant. **Soil and Fertilizers**, Taiwan, v.46, p.51, 1969.
- ZAROUG, M.G.; MUNNS, D.N. Screening strains of *Rhizobium* for the tropical legumes *Clitoria ternatea* and *Vigna trilobata* in different pH of soils. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.14, n.1, p.28-33, 1980.