

SOBREVIVÊNCIA DO *BRADYRHIZOBIUM* SP. EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS¹

MÁRCIA DO VALE BARRETO FIGUEIREDO², NEWTON PEREIRA STAMFORD³, CAIO VIDOR⁴,
JOSÉ JÚLIO VILAR⁵ e EMÍDIO CANTÍDIO DE OLIVEIRA FILHO⁵

RESUMO - Objetivando determinar as condições ideais para sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos (Diatomita, pó-de-coco, vinhaça seca, composto urbano, vermiculita e turfa) submetidos a diferentes potenciais matriciais (ψ_m de -0,33, -1,00 e -3,00), foi conduzido um experimento utilizando-se a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. UMKL 58, isolada de *Clitoria ternatea* L. na Malásia (NIFTAL). A avaliação das células viáveis (NCV) foi feita pela sobrevivência da estirpe nos diferentes materiais, utilizando os métodos de diluição e contagem em placas e o de infecção em plantas, com amostragens nos intervalos de 0; 12; 30; 60; 90; 120; 150; 180 e 240 dias após a inoculação. Os menores potenciais matriciais favoreceram o crescimento e a sobrevivência da bactéria, ao contrário do potencial elevado (-0,33 bar). A viabilidade da bactéria diferiu em relação aos substratos, e o desempenho foi consistente tanto na contagem em placas como na infecção em plantas. A diatomita foi comparável à turfa (veículo convencional), e quando avaliada em relação ao potencial matricial de -3,00 bar, a bactéria apresentou melhor sobrevivência, atingindo uma população de $3,6 \times 10^9$ células/g de inoculante aos seis meses de armazenamento.

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

SURVIVAL OF *BRADYRHIZOBIUM* SP. IN ALTERNATIVE LEGUME INOCULANT CARRIERS

ABSTRACT - To evaluate the survival of *Bradyrhizobium* sp. grown in alternative legume inoculant carriers (diatomaceous earth, powdered coconut fiber, dry vinasse, urban waste compost, vermiculite and peat) submitted to different matric water potential ($\psi_m = -0,33, -1,00$ e $3,00$ bar), an experiment was carried out using the *Bradyrhizobium* sp. (*Clitoria*) strain UMKL 58 (Malasia-NIFTAL). Survivals of bacteria were estimated by the number of viable cells using plate counting and plant infection techniques. Samples were taken from the different treatments at intervals of 0; 12; 30; 60; 90; 120; 150; 180 and 240 days during incubation. Lower matric water potentials increased growth and survival of *Bradyrhizobium* sp. as compared with -0,33 bar. Strain viability in the inoculant differed for each carrier, consistent in both plate count and plant infection techniques. Diatomaceous earth was similar to peat (usual carrier on commercial legume inoculant), and evaluated on -3,00 bar showed the best survival (microbial density of $3,6 \times 10^9$ viable cells per gram of inoculant), after six months of storage at 5°C.

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

¹ Aceito para publicação em 20 de fevereiro de 1992.

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

³ Eng. - Agr., Dr. Sc., Prof. - Adj., Dep. de Agron. UFRPE, CEP 52071 Recife, PE. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. - Adj., Dep. de Solos, UFRGS, CEP 91500 Porto Alegre, RS.

⁵ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. - Adj., Dep. de Agron., UFRPE, CEP 52071 Recife, PE.

INTRODUÇÃO

As leguminosas têm ao seu dispor duas fontes de nitrogênio: o mineral, proveniente do solo ou da aplicação de fertilizante, e o nitrogênio atmosférico (dinitrogênio), fixado biologicamente pelo processo simbiótico com bactérias do gênero *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*.

A forma de se levar a bactéria para regiões bem próximas às raízes é infectando as semen-

tes, e um dos problemas para a elaboração de inoculantes é a escassa disponibilidade de materiais aptos para uso como veículo. A maioria dos inoculantes disponíveis no mercado usa a turfa como substrato para o crescimento da bactéria, devido ao seu alto teor de matéria orgânica, por apresentar alta capacidade de retenção de água e pela sua fácil aquisição.

Estas características propiciam uma rápida proliferação e maior longevidade da bactéria introduzida, permitindo sua sobrevivência durante vários meses com alta densidade populacional (Alvarez et al. 1970). A sobrevivência da bactéria depende das características físicas, químicas e biológicas do substrato, como também da eficiência da estirpe empregada.

Os efeitos do conteúdo de umidade para sobrevivência devem ser considerados separadamente para inoculantes esterilizados e não esterilizados, uma vez que existe uma interação óbvia entre rizóbio e contaminantes em níveis específicos de umidade. O conteúdo de umidade de uma cultura tem efeito nas quantidades de rizóbio, não só o nível inicial é crítico, mas existe uma relação bem definida entre a taxa de morte e a taxa de perda de água durante o armazenamento do inoculante (Roughley & Pulsford 1982). Na preparação do inoculante é essencial que o conteúdo de umidade seja apropriado para poder determinar um veículo específico. O limite ideal de umidade para o inoculante deve levar em consideração o crescimento bacterial e o máximo de população atingida após a mistura e a sobrevivência bacterial.

A presente pesquisa tem por objetivo determinar a condição ideal de umidade para a sobrevivência do *Bradyrhizobium* em diferentes substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

As origens dos substratos usados foram: Diatomita (Carro Quebrado-RN); composto urbano (aterro sanitário da usina de tratamento de lixo da cidade do Recife, Curado, PE); vinhaça seca (Usina Estreliana, Ribeirão Preto, PE); vermiculita expandida (Eucatex S/A, São Paulo); Pó-de-coco (PLANALSUCAR, Carpina-PE) e Turfa (CNPBS - Km 47, Rio de Janeiro).

Estes materiais foram secados ao ar e passados em peneira de 200 mesh (0,074 mm). A seguir, procedeu-se às análises físicas, segundo a metodologia preconizada pela EMBRAPA (1979), e químicas, de acordo com a metodologia do Ministério da Agricultura (Brasil 1983). Os resultados são apresentados nas 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 cítrico para os alcalinos.

O volume de caldo acrescentado foi uniforme para todos os substratos, baseando-se como padrão os cálculos de menor potencial matricial (-3,00 bar), indicado para o composto urbano. A complementação para os demais potenciais foi procedida pela adição de meio (extrato de levedura-manitol) YEM líquido, de acordo com a retenção de cada material, para proporcionar as mesmas condições aos diferentes substratos.

Para cada amostra acondicionada em saco de polipropileno (espessura 0,05 mm), com 40g de material por pacote de inoculante, foi injetado assepticamente, por seringa hipodérmica esterilizada, a quantidade de caldo e de meio YEM. Imediatamente após a inoculação procedeu-se à limpeza com álcool no local ao redor da perfuração, vedando-se em seguida com fita adesiva esterilizada (Roughley 1970 e Date 1976), e logo após, os pacotes foram armazenados a 5°C.

Foram efetuadas contagens em placas nos períodos de 0; 12; 30; 60; 90; 120; 150; 180 e 240 dias após a inoculação, utilizando o meio YEMA com vermelho congo, corrigindo o pH para 6,8 e autoclavando a 125°C por 20 minutos. Após a autoclavagem, adicionou-se uma solução contendo cicloheximida na concentração de 50 ppm, esterilizada por filtração com membrana com poros 0,45 mm de diâmetro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts).

As diluições e infecção em plantas (Vincent 1970) foram efetuadas no período de 30 e 240 dias em câmara de crescimento, utilizando como planta teste a cunhã (*Citioria ternatea* L.), sendo as sementes escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (Zaroug & Munns 1980).

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com três fatores (tempo, potencial matricial e substratos), com duas repetições e oito subamostragens. Foram calculados índices de correlação, bem como modelos de regressão do tipo linear simples para se obter informações sobre o grau de associação entre os métodos do número mais provável (NMP) e o de placas.

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/cm ³				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 residualdr⁺⁺ = Densidade realda⁺⁺⁺ = 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	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 são mostradas as curvas características de retenção de água para cada substrato utilizado. Observou-se que à medida que o potencial matricial se tornou mais negativo (abaixo de -5,00 bar), a variação do teor de umidade para cada substrato foi insignificante. O teor de umidade dos substratos variou grandemente entre -0,33 e -3,00 bar. Dessa forma os estudos de sobrevivência foram feitos a potenciais matriciais de -0,33, -1,00 e -3,00 bar. Todavia, na padronização da granulometria dos substratos verificou-se que ocorreu uma grande variação no teor de umidade para semelhantes potenciais, dadas as características próprias dos materiais.

Para o intervalo de potencial compreendido entre -0,33 e -5,00 bar, a capacidade de retenção aumentou na seqüência seguinte: composto urbano, vinhaça seca, vermiculita, turfa e pó-de-coco. O substrato diatomita teve um comportamento diferenciado, apresentando alta retenção à baixa tensão (potencial elevado), conseguindo ainda mantê-lo superior aos três primeiros substratos na faixa estudada. Portanto, torna-se bastante importante relacionar a sobrevivência da bactéria com a energia da água retida no substrato, e não com o teor de umidade, que varia de substrato para substrato.

A Fig. 2 mostra o resultado do efeito dos níveis de potencial matricial no logaritmo do número de células viáveis (NCV) em relação ao

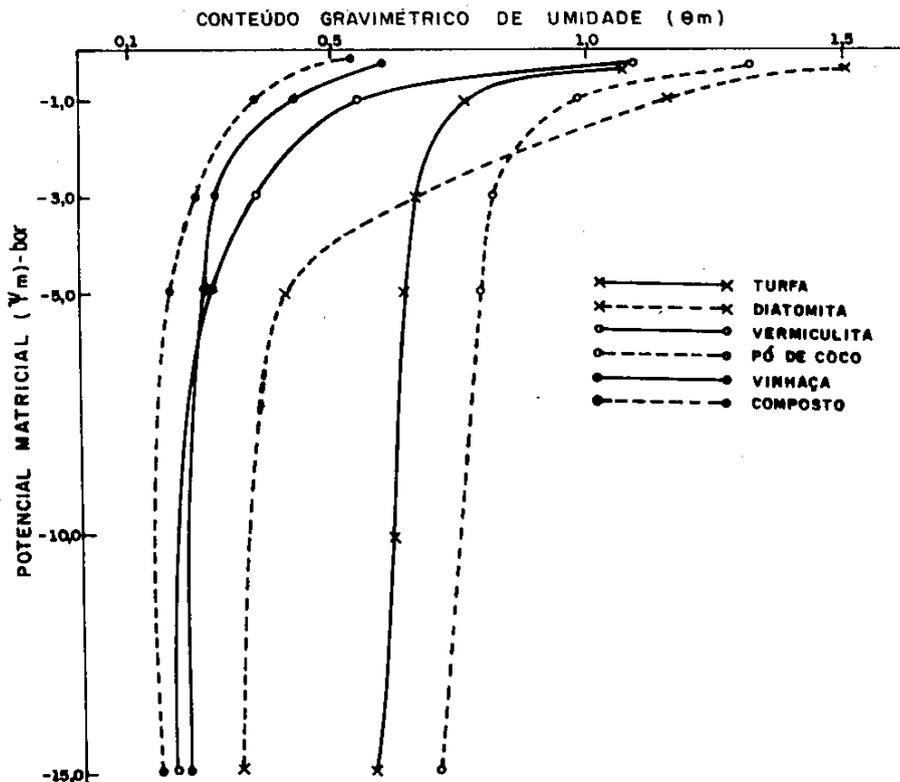


FIG. 1. Curvas características de umidade dos substratos.

substrato. Independentemente do nível de potencial matricial, os substratos turfa e diatomita apresentaram NCV estatisticamente superiores aos demais. O melhor nível de potencial matricial ocorreu a -1,00 bar, exceto para a diatomita e o pó-de-coco, onde o NCV foi maior ao potencial de -3,00 bar. Observa-se que a potencialidade da diatomita, quando estudada em seu melhor nível de potencial matricial, foi superior à turfa.

A Fig. 3 mostra o NCV nos três potenciais estudados nos respectivos intervalos de tempo, e observa-se que, com exceção do tempo zero, o NCV cresceu inversamente ao potencial matricial ao longo do período estudado. Possivelmente, os baixos valores de NCV no potencial -0,33 bar deve-se ao fato de que este potencial

apresenta um maior conteúdo de umidade, que de certa forma prejudicou as trocas gasosas necessárias aos microrganismos aeróbios, resultados concordantes com os obtidos por Thompson (1980) e Date (1976).

A Fig. 4 mostra o estudo da sobrevivência da bactéria nos seis substratos usados, abrangendo um período de 240 dias após a mistura do inóculo, com interação significativa. A primeira contagem $t=0$, permitiu avaliar a capacidade de adsorção bacteriana de cada substrato com base na recuperação, avaliada pelo número obtido na contagem do inoculante e o número de células adicionais por grama de inoculante. Dos substratos estudados, o pó-de-coco e a vermiculita apresentaram um ligeiro declínio populacional aos 30 dias, que pode ser explicado pro-

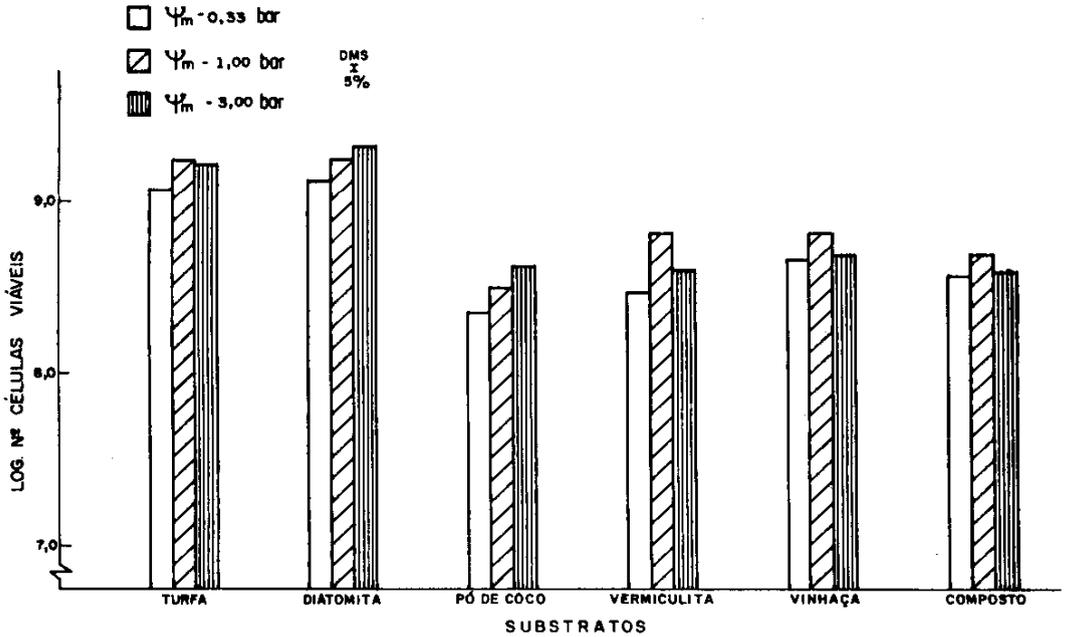


FIG. 2. Efeito do potencial matricial na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos alternativos.

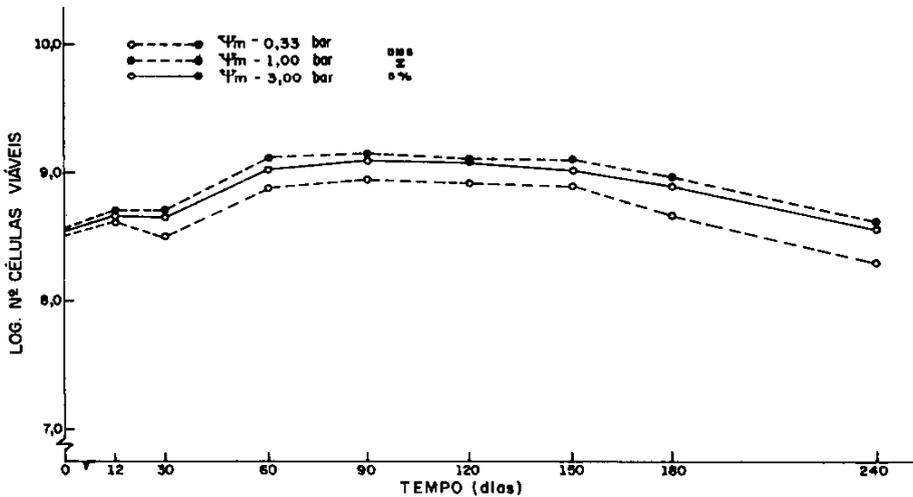


FIG. 3. Efeito do potencial matricial na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos substratos alternativos em diferentes intervalos de tempo.

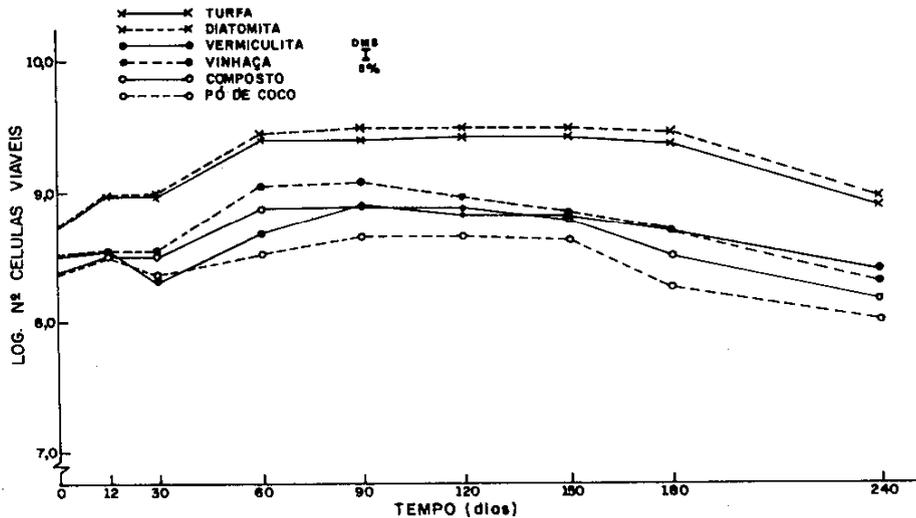


FIG. 4. Efeito do tempo na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos alternativos, em função do potencial matricial.

vavelmente pela presença de alguns microrganismos antagonísticos, identificados como *Penicillium* e *Cladosporium*.

Trabalhos realizados por Roughley & Vincent (1967) e Burton (1981) comentam que, dependendo da característica dos veículos, tanto valores altos como baixos de umidade podem interferir na população antagonística pela competição de nutrientes, porém a níveis mais baixos são menos favorecidos.

Existe uma relação bem definida entre a taxa de morte da bactéria e a taxa de perda de água durante o armazenamento. Tal perda pode ocorrer também quando os veículos são armazenados sob refrigeração, em algumas embalagens (Vincent 1980). Os cálculos da taxa de mortalidade semanal foram feitos com o uso da fórmula $k = (1/t \times B/b)$, onde B e b são os números iniciais e finais de células em logaritmo, por contagem no tempo t, expresso em semanas. Estes cálculos, efetuados com 90 a 240 dias, registraram o número máximo para cada veículo, e a sua respectiva perda de viabilidade bacteriana, onde $k=0,0535$ para o potencial matricial

de -0,33 bar; $k=0,0532$ para -1,00 bar e $k=0,533$ para -3,00 bar. Esses valores estão próximos aos observados por Lopes & Giardini (1977) trabalhando com *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em turfa esterilizada, enquanto Freire & Jones (1963) observaram decréscimos gradativos e maiores em *Bradyrhizobium japonicum*. Trabalhos realizados na Austrália por Roughley & Vincent (1967) concluíram que a taxa de mortalidade da estirpe em inoculantes, depende das espécies. Steinborn & Roughley, citados por Roughley (1976) observaram que o potencial de água ideal para a maioria das estirpes de *Rhizobium* localiza-se a pF 3,9 (aproximadamente -7,9 bar).

O teor de umidade dos inoculantes, determinado por ocasião da primeira e da última amostragem foi calculado em relação aos substratos estudados, com perdas variando entre 0,30 a 0,97%. (Tabela 3). Foi observado que umidade acima de 50% e abaixo de 30% promoveu perdas mais elevadas. Roughley & Vincent (1967) demonstraram que o nível de umidade afetou o tempo de armazenamento do inoculante turfo nos limites de 30% e 60% na base de peso de

TABELA 3. Teor de umidade inicial e final na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. submetidos a diferentes potenciais matriciais nos substratos.

Tratamento	ψ m	PSU ¹	U ³	PSU ²	U	Perda de umidade %
		(g)	%	(g)	%	
		Inicial		Final		
Turfa	-0,33	83,20	51,92	82,40	51,45	0,47
	-1,00	70,40	43,18	69,80	42,69	0,49
	-3,00	66,80	40,11	66,13	39,51	0,60
Pó-de-coco	-0,33	92,40	56,70	91,30	56,18	0,52
	-1,00	79,20	50,00	78,80	49,23	0,77
	-3,00	72,40	44,75	71,16	43,78	0,97
Diatomita	-0,33	100,00	60,00	98,10	59,22	0,78
	-1,00	86,00	53,48	84,40	52,60	0,88
	-3,00	67,20	40,47	66,20	39,57	0,90
Vermiculita	-0,33	83,60	52,15	82,00	51,21	0,94
	-1,00	62,00	35,48	61,30	34,74	0,74
	-3,00	54,00	25,92	53,50	25,23	0,67
Vinhaça seca	-0,33	64,00	37,50	63,70	37,20	0,30
	-1,00	57,20	30,06	56,50	29,20	0,86
	-3,00	51,20	21,87	50,70	21,10	0,77
Composto urbano	-0,33	61,60	35,06	61,04	34,46	0,60
	-1,00	54,00	25,92	53,57	25,33	0,59
	-3,00	49,60	19,35	49,05	18,45	0,90

¹ Peso do substrato úmido (tempo = 0)

² Peso do substrato úmido (tempo = 240 dias)

³ Percentagem de umidade com base no peso úmido

material úmido.

No estudo do tempo em relação ao substrato (Fig. 4), o intervalo de 60 a 180 dias não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) no NCV entre os substratos turfa, diatomita e pó-de-coco no intervalo 90 a 150 dias; vermiculita no intervalo entre 90 a 120 dias; vinhaça entre 60 e 90 dias e composto urbano entre 60 e 120 dias.

O maior número de bactérias para todos os substratos ocorreu aos 90 dias, sendo este considerado o ponto máximo de crescimento. Os resultados apresentados estão de acordo com os obtidos por Date (1976), ao estudar a sobrevivência de *Rhizobium meliloti* em turfa estéril,

tendo o autor encontrado a maior densidade populacional aos três meses de incubação, em condições similares de armazenagem.

Pode-se verificar, na Fig. 5, a comparação das estimativas de uma quantidade de inoculante, baseada na contagem em placas, onde as estimativas foram comparadas por ambas as leituras na mesma série de diluição. A diferença entre as duas estimativas está dentro dos 95% de confiabilidade ($\pm 0,82$) do método da infecção de plantas. O coeficiente de correlação ($r=0,971$) indicou alta significância entre NMP e placas no período de armazenagem de 30 dias.

Em geral, a contagem pela infecção em plantas subestimou a quantidade de bactérias viáveis.

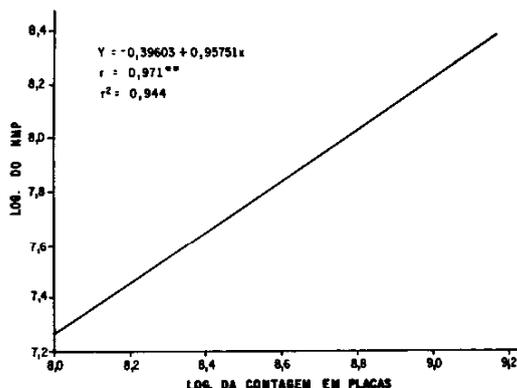


FIG. 5. Correlação entre o número mais provável-NMP(Y) e contagem em placas (X) na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos, em função do potencial matricial armazenados 30 dias.

veis, quando comparado com o método de diluição e contagem em placas. Resultados similares foram encontrados por Date & Vincent (1962), Hiltbold et al. (1980) e Kremer & Peterson (1982), que verificaram diminuição da contagem pelo método em relação ao método da contagem em placas. Brockwell (1963) estudou a precisão do método do NMP e as estimativas oscilaram entre 89 e 131% das avaliadas pelo método de contagem em placas.

Na avaliação da população bacteriana dos veículos pelos métodos da diluição e infecção em plantas e da contagem em placas, armazenados durante 240 dias (Fig. 6), foi observada correlação relativamente baixa ($r=0,683$), apesar de apresentar alta significância ($P < 0,01$). Porém, analisando os resultados na ausência do substrato pó-de-coco, onde houve uma grande variação entre os dois métodos, o coeficiente de correlação ($r=0,900$) foi significativo. Mais uma vez a contagem pelo NMP subestimou a quantidade de bactérias viáveis, porém dentro do limite de confiabilidade. Com relação ao substrato pó-de-coco, onde a contagem em placas excedeu a estimativa baseada pelo NMP, a nodulação foi prejudicada, indicando que algum fator interferiu na capacidade de infecção na planta, devendo este material continuar a ser estudado, visto que houve uma considerável diminuição no NCV, comprovada pelo coeficiente de correlação.

Weaver & Frederick (1972) encontraram em duas instâncias valores baixos de NMP em experimentos com *Bradyrhizobium japonicum*, e Date & Vincent (1962) também encontraram valores abaixo do limite de confiabilidade para NMP em *Medicago triguloides*. Estes resultados confirmaram que o substrato pó-de-coco, como veículo de inoculação, deve ser melhor estuda-

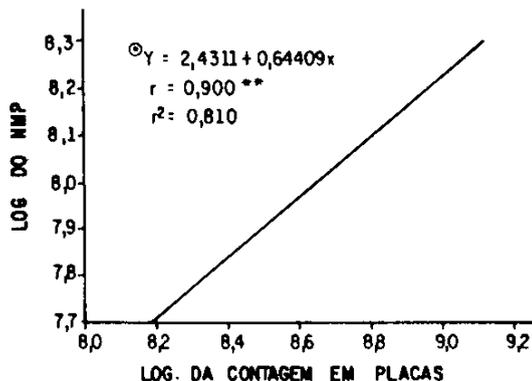
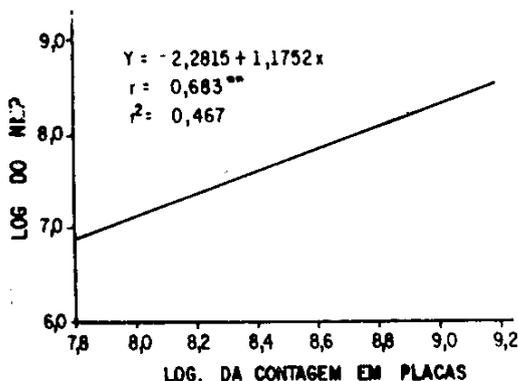


FIG. 6. Correlação entre o número mais provável-NMP(Y) e contagem em placas(X) na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos, em função do potencial matricial armazenados 240 dias.
 ⊙ Ausência do substrato pó-de-coco

do. Os demais substratos podem ser considerados de boa qualidade, pois atendem aos requisitos exigidos pela legislação e comercialização de insumos biológicos, pois sempre alcançaram, nos períodos de armazenamento, uma população bacteriana acima de 10^7 células por grama do inoculante.

CONCLUSÕES

1. Os diferentes veículos variaram na capacidade de reter água, e portanto o uso do conceito do potencial de água, representado pelo potencial matricial, é mais preciso do que o conteúdo gravimétrico de umidade, visto que o movimento, absorção, evaporação e retenção, são funções da energia da água no substrato.

2. O *Bradyrhizobium* sp. teve melhor sobrevivência no substrato diatomita quando submetido a menor potencial matricial; porém, o crescimento e sobrevivência da bactéria em todos os veículos, sob potencial matricial elevado foram reduzidos, como conseqüência do maior conteúdo de umidade.

3. Com exceção do pó-de-coco, os materiais usados podem ser considerados de boa qualidade para uso na produção de inoculante, pois atendem aos requisitos exigidos pela legislação de insumos biológicos.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A.; MAS, J.; MARGOSION, C. Produção industrial de inoculantes. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA DE *RHIZOBIUM*, 1970, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro Sul, 1970. p.346-348.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes, métodos oficiais. [S.l.:s.n.], 1983. 103p.
- BROCKWELL, J. Accuracy of plant injection technique for counting population of *Rhizobium trifolii*. *Applied Microbiology*, Washington, v.11, p.377-383, 1963.
- BURTON, J.D. *Rhizobium* inoculant for developing countries. *Tropical Agriculture*, London, v.58, n.4, p.291-303, 1981.
- 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.; VINCENT, J.M. Determination of the number of root nodule bacteria in the presence of other organisms. *Australian Journal Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Victoria, v.2, p.5-7, 1962.
- EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de solos. *Manual de Análises de Solo*. Rio de Janeiro, 1979. v.1.
- FREIRE, J.R.J.; JONES, S.H. Influência da temperatura de armazenamento e da perda de umidade na longevidade dos inoculantes de leguminosas. *Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária*, Porto Alegre, v.6, p.85-93, 1963.
- HILTBOLD, D.A.E.; THURLOW, D.L.; SKIPPER, H.D. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. *Agronomy Journal*, Madison, v.72, p.675-681, 1980.
- KREMER, R.J.; PETERSON, H.L. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seeds. *Soil Science*, Baltimore, v.134, n.2, p.117-125, 1982.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R. Sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa esterilizada. *Bragantia*, Campinas, v.36, p.39-41, 1977.
- 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. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P.S. (Ed.). *Symbiotic nitrogen fixation in Plants*. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.125-136.
- ROUGHLEY, R.J.; PULSFORD, D.J. Production and control of legume inoculants. In: VINCENT, J.M. *Nitrogen Fixation in Legume*. Austrália: Academic Press, 1982. p.193-209.
- ROUGHLEY, R.J.; VINCENT, J.M. Growth and survival of *Rhizobium* sp. in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, London, v.30, n.2, p.362-376, 1967.

- THOMPSON, J.A. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGERSEN, F.J. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York: John Wiley, 1980. p.490-533.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of *Rhizobium* of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwells Scientific Publication, 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.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. A new technique for most probable number counts of *Rhizobium*. **Plant and Soil**. The Hague, v.36, p.219-222, 1972.
- ZAROUG, M.G.; MUNNS, D.N. Screening strains of *Rhizobium* for the tropical legumes *Clitoria ternatea* and *Vigna trilobata* in soil of different pH. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.14, n.1, p.28-33, 1980.