

***Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em Diferentes Áreas
de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica***



República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 69

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

***Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em
Diferentes Áreas de um Sistema Integrado de Produção
Agroecológica***

*Jerri Edson Zilli
Dejair Lopes de Almeida
Norma Gouvêa Rumjanek
Maria Cristina Prata Neves*

Seropédica - RJ
1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa *Agrobiologia*

Caixa Postal 74505

23851-970 - Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

ZILLI, J.E.; ALMEIDA, D.L. de; RUMJANEK, N.G.; NEVES, M.C.P. **Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em Diferentes Áreas de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica.** Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69).

ISSN 0104-6187

1. Biodiversidade 2. Rhizobium. I. Almeida, D.L. de, colab. II. Rumjanek, N.G., colab. III. Neves, M.C.P., colab. IV. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). V. Título. VI. Série.

CDD 333.95

SUMÁRIO

<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>4</i>
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>6</i>
<i>RESULTADOS</i>	<i>7</i>
<i>DISCUSSÃO</i>	<i>11</i>
<i>CONCLUSÕES.....</i>	<i>14</i>
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>14</i>

Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em Diferentes Áreas de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica

*Jerri Édson Zilli¹
Dejair Lopes de Almeida²
Norma Gouvêa Rumjanek²
Maria Cristina Prata Neves²*

INTRODUÇÃO

A biodiversidade microbiana é um recurso precioso, embora pouco visível, merece grande atenção. O fato dos microrganismos não serem visíveis a olho nu, não significa que tenham pouco valor. Eles são essenciais para a sustentabilidade da biosfera, reciclando nutrientes, produzindo e consumindo gases que afetam o clima global, destruindo poluentes e decompondo detritos. Na agricultura tanto representam agentes de doenças de plantas e animais, como podem ser fonte de substâncias medicinais, incluindo agentes antimicrobianos, anti-helmínticos, anti-tumorais, além de fontes de vitaminas, enzimas, imunossuppressores e imunomoduladores. São os principais agentes de controle biológico de pragas, produtores de substâncias de ação inseticida e enriquecedores do solo, solubilizando nutrientes de rochas ou transformando o inerte nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis por plantas e animais.

A diversidade microbiana de solo é provavelmente um fator determinante do estado de sustentabilidade do sistema. No entanto, avaliações deste parâmetro têm se mostrado complexas, dificultando a obtenção de indicadores capazes de alertar para estágios de degradação de solo que comprometam a produção agrícola.

O nitrogênio é o nutriente que mais limita o desenvolvimento das plantas, principalmente nos solos poucos férteis das regiões tropicais. Paradoxalmente, o nitrogênio é o elemento mais abundante na nossa atmosfera porém nesta forma gasosa não pode ser assimilado por plantas e animais. Somente, algumas bactérias e actinomicetos desenvolveram mecanismos enzimáticos que os permitem converter o nitrogênio gasoso em

¹ Estudante de Pós-Graduação da UFRRJ, Embrapa **Agrobiologia**

² Pesquisadores da Embrapa **Agrobiologia**, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

amônia e amino-ácidos, formas capazes de serem usadas pelos demais seres vivos. Estes microrganismos são conhecidos como fixadores de nitrogênio.

Associados ou em simbiose com culturas de interesse, estes microrganismos representam uma importante estratégia capaz de promover economia no uso de fertilizantes nitrogenados, diminuindo o custo de produção de alimentos. Os rizóbios representam um grupo de microrganismos fixadores de nitrogênio capaz de formar simbiose com leguminosas. A simbiose do rizóbio com a soja promove uma economia no uso de fertilizantes nitrogenados estimada em 1,5 bilhões de dólares que deixam de ser gastos a cada ano.

O uso de rizóbios associados com leguminosas nos sistemas de produção agrícola é freqüentemente limitado por problemas relacionados com a sobrevivência da bactéria no solo e a competição com rizóbios nativos do solo.

A caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é uma ação importante para orientar a recomendações de estirpes selecionadas para serem usadas como inoculante das culturas, possibilitando a utilização mais eficiente destas bactérias nos sistemas de produção.

A avaliação das populações de rizóbio é facilitada a partir da utilização de plantas iscas e isolamento a partir dos nódulos formados. Além disso as características morfológicas de rizóbios fornecem informações importantes para identificação e agrupamento de estirpes. Assim avaliar o tempo de crescimento, reação de pH, consistência do muco produzido são características importantes no agrupamento destes isolados. Um levantamento feito em solos do Sertão, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco mostrou uma enorme diversidade na população de rizóbios dos solos estudados (Martins et al. 1995)

O levantamento da população de rizóbio em áreas do Sistema Integrado de Produção Agroecológica foi feito com o objetivo de entender o padrão de distribuição espacial e temporal da diversidade deste grupo de microrganismo, bem como sua dispersão e restrição.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DE SOLO - Dentro do Sistema Integrado de Produção Agroecológica, selecionou-se três áreas com aproximadamente 300 m² cada uma: Bosque (floresta remanescente), Pasto (área com cobertura de gramíneas) e Cultivo (área com cultivo convencional) (Vide mapa em anexo). Cada área foi subdividida em 12 parcelas. Em duas destas parcelas coletou-se solo a 20 cm de profundidade, com 12 amostras simples cada parcela.

CULTIVO DE PLANTAS ISCAS – As amostras compostas de cada uma das parcela foram diluídas com 1/3 de areia previamente autoclavada e cultivado em casa de vegetação com sementes de caupi (*Vigna unguiculata*), siratro (*Macropitilum atropurpureum*) e indigófera (*Indigofera hirsuta*) que foram desinfestadas com peróxido de hidrogênio por três minutos. A irrigação das plantas foi realizada diariamente com água esterilizada. Após 45 dias do plantio os nódulos formados nas raízes foram coletados e isolados.

ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO - Primeiramente os nódulos foram lavados com etanol 90% por 1 minuto, seguido de imersão em HgCl₂ 1% por dois minutos e lavados por 8 vezes com água estéril. Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre o meio 79 (Vincent, 1970) contido em placa de Petri em presença de azul de bromotimol. Após o isolamento incubou-se as placas a 28°C até o surgimento de colônias crescidas e isoladas. Foram isolados inicialmente 30 nódulos obtidos das plantas de caupi de cada uma das áreas, com o objetivo de estudar a diversidade de rizóbio em diferentes áreas. Em uma segunda etapa realizou-se novo isolamento agora com o objetivo de avaliar a diversidade de rizóbio que nodularam as diferentes espécies de leguminosas testadas.

CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS – As colônias crescidas sem contaminantes foram transferidas para outra placa contendo também o meio 79 (Vincent, 1970). Aguardou-se novamente o crescimento das colônias e realizou-se a caracterização observando: dias para o surgimento das colônias, reação de pH após o crescimento das colônias, diâmetro, forma e elevação das colônias, presença, quantidade, consistência e transparência do muco.

RESULTADOS

O Sistema Integrado de Produção Agroecológica (Figura 1), foi implantado em 1993 em solos Podzólicos vermelho – amarelos e Planossolos de baixa fertilidade que vêm sendo desde então manejados organicamente, baseado na utilização de processos biológicos do solo para intensificar a ciclagem de nutrientes e a biodiversidade e racionalizar o uso dos recursos naturais. Inicialmente, a acidez dos solos foi corrigida com a incorporação de calcário dolomítico. Baseado nas análises de fertilidade, a adubação das culturas tem sido feita através da incorporação de esterco de “ curral ”, fresco ou curtido, por ocasião do plantio das espécies herbáceas (hortaliças e cereais), além de uma mistura de termofosfato Yoorin e cinza de lenha, visando o aporte de macro (P e K) e micronutrientes.

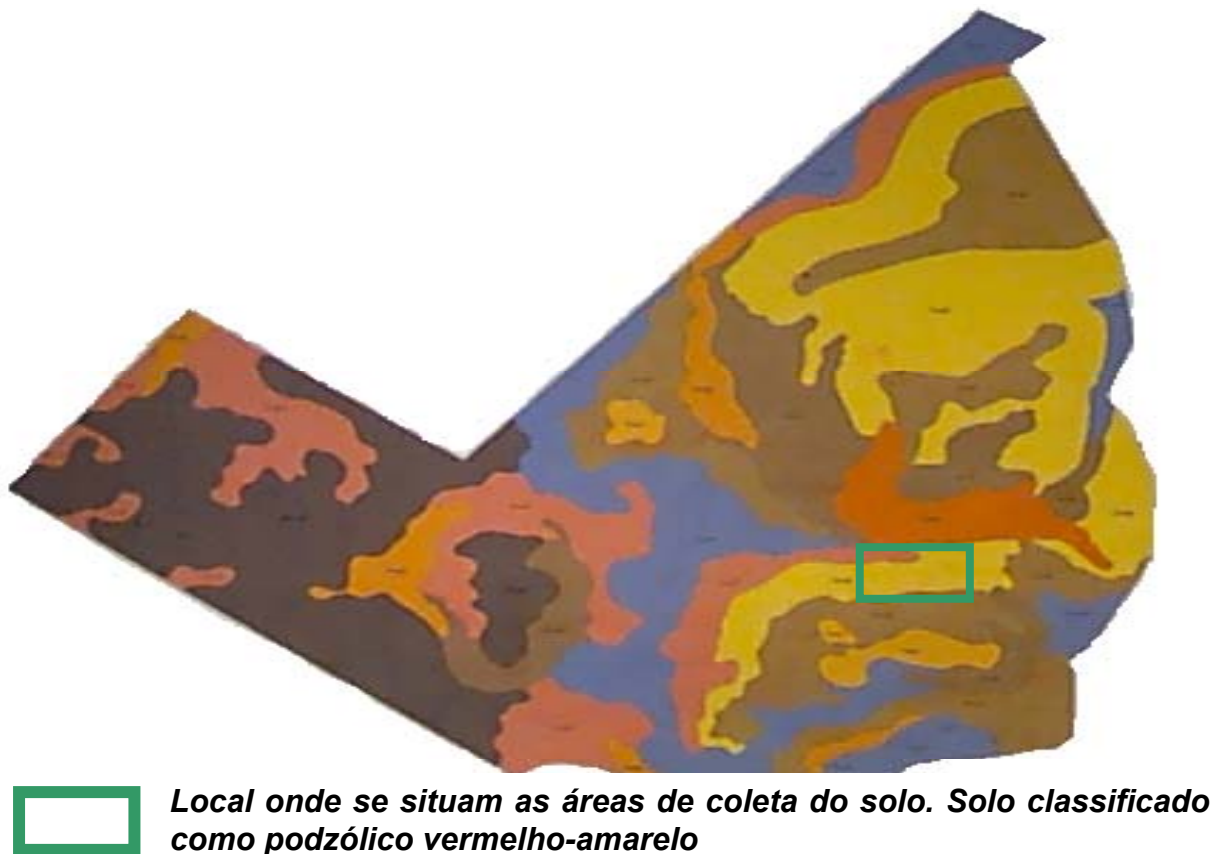


Figura 1. Mapa de levantamento semi-detalhado dos solos da área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica

A adubação verde com leguminosas tem sido usada em consórcios ou rotações de culturas com o uso de espécies de crotalaria e mucuna, além de feijão de porco, guandu, caupi e amendoim forrageiro. Os solos têm sido protegidos mediante utilização de cobertura viva, seja com a própria vegetação espontânea, manejada através de roçadas periódicas e de modo seletivo, deixando-se as leguminosas de ocorrência espontânea, dentre as quais se destaca a *Indigofera hirsuta*, conhecida como anileira. Os estudos abrangeram a área do bosque, a pastagem e a área sob cultura de olerícolas (Figura 2).

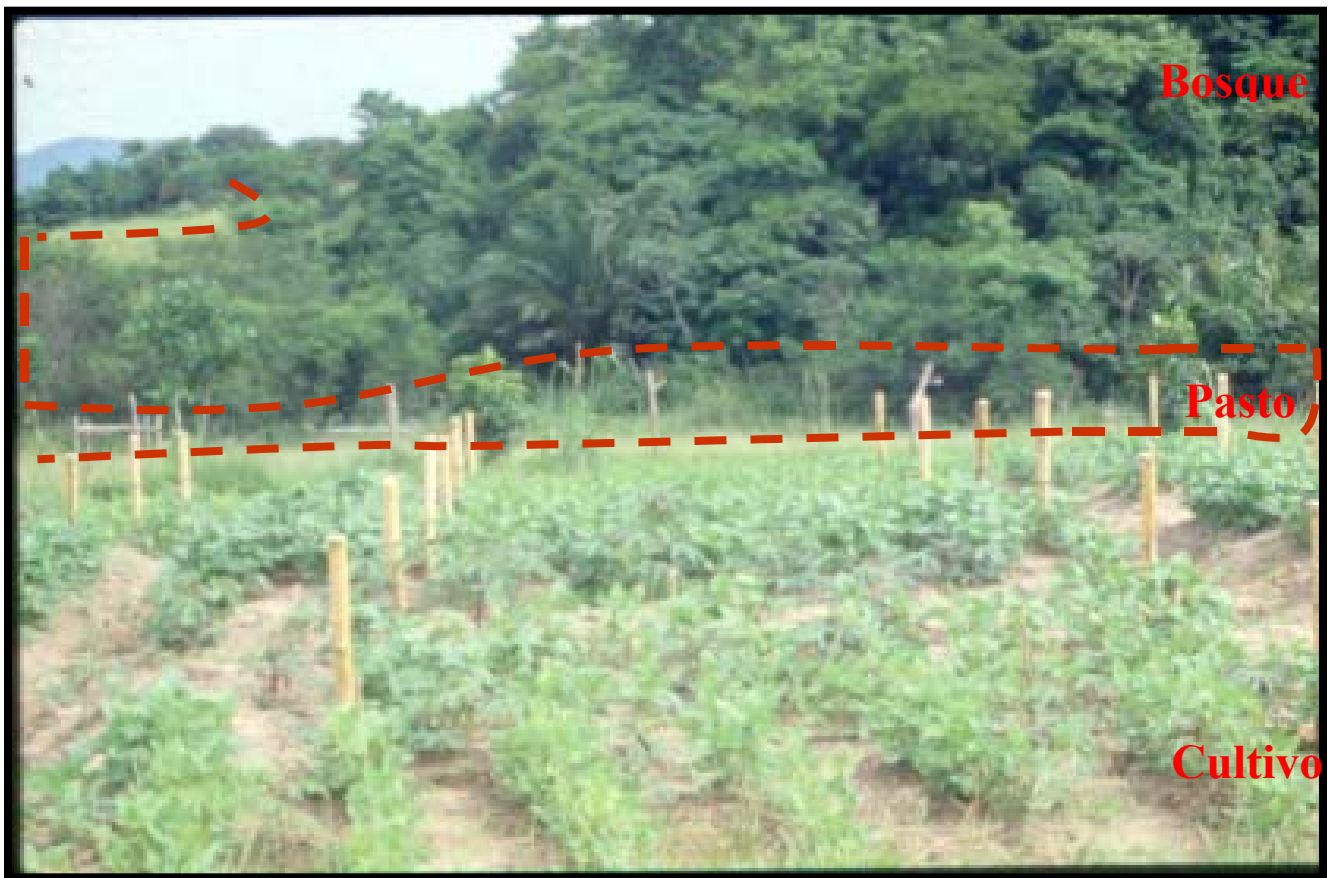


Figura 2. Áreas Selecionadas: Bosque, Pasto e Cultivo

A distribuição dos isolados por área no primeiro isolamento pode ser observada na Tabela 1. A morfologia da colônia tem sido um parâmetro adotado para caracterizar populações rizobiais em diferentes ecossistemas e até em diferentes profundidades de solo, (Jenkins et al., 1989). Fuhrmann (1990), considerou a caracterização morfológica, como um parâmetro bastante útil na avaliação da eficiência simbiótica das estirpes de *Bradyrhizobium* que

nodulam soja. Dos noventa nódulos isolados das raízes de caupi em meio 79, foram obtidos 81 isolados, distribuídos em 15 grupos morfológicamente diferentes, quanto as seguintes características: velocidade de crescimento, reação de pH (Tabela 2) e consistência do muco produzido (Tabela 3). Foram encontrados em alguns nódulos, dimorfismo da colônia, resultando em dois isolados.

Tabela 1. Distribuição de isolados por área de estudo de acordo com aparecimento do grupo em uma única área, em 2 áreas ou nas 3 áreas de estudo. B - grupos exclusivos da área do bosque, P - grupos exclusivos da área do pasto, E - grupos exclusivos da área de cultivo, B/P - grupos comuns às áreas do bosque e pasto, P/E- grupos comuns às áreas do pasto e cultivo, B/P/E - grupos comuns às áreas do bosque, pasto e cultivo.

Grupo	Características Principais de cada grupo	Distribuição de isolados por área de estudo										Total		
		Grupos exclusivos			Grupos comuns									
					B/P		P/E		B/P/E					
		B	P	E	B	P	P	E	B	P	E			
01	Lento, ácido, butírico	12	-	-	-		-	-	-	-	-	12		
02	Lent. ác. Floculoso	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
03	Lent. ác. Viscoso	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
04	Lent. alcalino aquosa	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1		
05	Lent. alc. Butírico	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
06	Lent. alc. Floculoso	-	-	-	-	-	-	-	5	4	3	12		
07	Lent. alc. Seco	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
08	Lent. alc. Viscoso	-	-	-	-	-	-	-	1	10	16	27		
09	Lent. Neutrobutírico	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2		
10	Lent. Eutrofloculoso	-	-	-	2	4	-	-	-	-	-	6		
11	Lent. neutro viscoso	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	5		
12	Ráp. ác. Seca	1	-	-	-		-	-	-	-	-	1		
13	Ráp. ác. Viscoso	-	-	-	-	-	8	1	-	-	-	9		
14	Ráp. alc. Viscosa	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1		
15	Ráp. neutro seco	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
TOTAL		17	2	1	3	5	11	3	1	14	19	81		

Os resultados, referentes à diversidade de rizóbio, foram analisados neste estudo através da determinação dos índices de Margalef e Menhinick, capazes de avaliar a riqueza dos grupos por área (Tabela 4).

Tabela 2. Percentagem de rizóbios que nodulam caupi, obtidos a partir de amostras de solo de três áreas do SIPA, em relação a presença ou consistência do muco produzido.

Áreas de estudo	Isolados número.área ⁻¹	Tipos de mucos produzidos pelos isolados de rizóbio				
		Viscoso (%)	Floculoso (%)	Butírico (%)	Seco (%)	Aquoso (%)
Pasto	32	68	26	3	3	0
Bosque	26	11	26	56	7	0
Cultivo	23	78	17	0	0	5

Tabela 3. Comparação entre a velocidade de crescimento e a reação de pH, promovidos pelos isolados obtidos de nódulos de caupi coletados a partir de amostra de solo das 3 áreas de estudo:

Áreas de Estudo	Velocidade de crescimento					
	Lenta			Rápida		
	pH do meio de cultura após o crescimento da colônia					
	ácido (%)	Neutro (%)	Alcalino (%)	Ácido (%)	Neutro (%)	Alcalino (%)
Bosque	54	12	26	4	4	0
Pasto	0	25	47	25	0	3
Cultivo	0	9	87	4	0	0

Tabela 4. Dados utilizados para a avaliação de diversidade de grupos de rizóbio: A- Total de grupos encontrados em cada área; B- Número de grupos exclusivos de cada área; Índice de Margalef ($DMG=(S-1)/\ln N$) e Índice de Menhinick ($DMN=S/N$).

Áreas de estudo	A- Número total de grupos	B- Número total de grupos exclusivo	Índice de diversidade de Margalef	Índice de diversidade de Menhinick
Bosque	10	6	2.76	1.96
Pasto	8	2	2.02	1.41
Cultivo	5	1	1.28	1.04

Na segunda etapa de isolamento, os isolados foram classificados morfológicamente e separados em grupos de acordo com a planta-isca (*Vigna unguiculata*, *Macopitilum atropurpureum* e *Indigofera hirsuta*). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 5- Grupos morfologicamente distintos isolados de espécies das tribos Phaseoleae e Indigoferae (*Vigna unguiculata*, *Macopitulum atropurpureum* e *Indigofera hirsuta*). C, S, I – representam grupos exclusivos para caupi, siratro e indigófera; C/S- grupos comuns a caupi e siratro, C/I- grupos comuns a caupi e indigófera, C/S- grupos comuns a siratro e indigófera e C/S/I- grupos comuns às três espécies. Os valores representam o número de isolados em cada classe.

Grupos Obtidos	Distribuição dos isolados para as diferentes espécies												Total
	Grupos Exclusivos			Grupos comuns as diferentes espécies									
				C/S		C/I		S/I		C/S/I			
	C	S	I	C	S	C	I	S	I	C	S	I	
01	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
02	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	5
03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1	1	8
04	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1
05	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
06	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2
07	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
08	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	4
09	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2
11	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	5
12	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
14	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
15	-	-	-	-	-	2	5	-	-	-	-	-	7
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	4	25	48
17	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
18	-	-	-		-	-	-	-	-	2	1	7	10
19	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
20	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	5
21	-	-	-	-	-	1	5	-	-	-	-	-	6
Total	2	6	1	6	5	10	13	2	2	27	6	34	114

DISCUSSÃO

Partindo-se do objetivo geral do trabalho realizado no SIPA foi feito o agrupamento e a diferenciação dos isolados, através das três características morfológicas selecionadas (velocidade de crescimento, pH e muco) quando ficou evidenciada a grande diversidade

da população de rizóbio presente. Essas diversidades morfológicas indicam a possibilidade de diversidade genética presente na população destes solos.

Na comparação das três áreas, percebe-se que o bosque e o pasto possuem diversidades semelhantes (9 grupos com características morfológicas diferentes), e que o campo é menos diverso (5 grupos com características morfológicas diferentes). Se estudarmos cada característica separadamente, percebe-se que a velocidade de crescimento é mais diversa na área do pasto. Há um predomínio de bactérias de crescimento lento, cerca de 69%, porém com 31%. Seguindo esta característica observa-se que tanto o experimento, como o bosque, apresentaram praticamente 100% de bactérias que se desenvolveram a partir do quarto dia. A reação de pH chama a atenção na área do campo, mais de 90% dos isolados, alcalinizaram o meio na placa, enquanto que as outras áreas houveram resultados peculiares entre si, ficando uma proporção semelhante quanto a acidificação, neutralidade ou alcalinização do meio.

No isolamento realizado dos nódulos obtidos das três espécies, obteve-se 114 bactérias, das quais 35 cresceram até o terceiro dia, onde inclui-se 19 bactérias que cresceram logo no primeiro dia. Percentualmente 31% cresceram até o terceiro dia. Bactérias com crescimento rápida nodularam preferencialmente com a tribo Phaseoleae. O siratro apresentou 60% dos seus isolados com crescimento até 3 dias, embora tenha se obtido apenas 19 isolados para esta espécie, enquanto as demais se obteve 45 para o caupi e 49 para indigófera. O motivo deste baixo número de isolados parece apontar por não adequação do meio de cultura com estes isolados. Portanto não seria correto afirmar que o siratro nodula preferencialmente com bactérias de crescimento rápido.

Franco & Siqueira, 1988, apontam o caupi como uma planta que nodula apenas com bactérias de crescimento lento. Dados conflitantes foram encontrados por Martins, 1996; em um estudo realizado na região nordeste do Brasil. Este autor apresenta um expressivo número de rizóbios com crescimento rápido capazes de nodular caupi. No trabalho desenvolvido, observou-se que 35% de um total de 45 bactérias isoladas do caupi tiveram um crescimento em meio de cultura até o terceiro dia, sendo que 24% destes isolados cresceram logo no primeiro dia.

A indigófera foi a espécie que menos apresentou bactérias com crescimento rápido em meio de cultura. Apenas 6 bactérias de um total de 49 tiveram crescimento até o

terceiro dia. Isto pode ser justificado talvez por que esta espécie vegetal está naturalmente dispersa na região e teria selecionado uma possível população de bactérias.

A partir das características morfológicas observadas das bactérias em placa de Petri, agrupou-se estes isolados. Como mostra a tabela 05, tem-se grupos exclusivos e comuns entre as espécies. De um modo geral obteve-se 9 grupos exclusivos. Os demais grupos foram comuns a pelo menos 2 espécies. Sobressai-se nesta análise os isolados de indigófera, pois obteve-se apenas um grupo exclusivo morfológicamente diferente, representado por apenas uma bactéria. 51% dos isolados de indigófera apresentaram características comuns e foram agrupados em apenas 1 grupo. Este grupo que também reuniu 42% dos isolados de caupi, apresenta como características principais, crescimento lento em meio de cultura, reação de pH alcalino, colônia opaca, presença de muco tipo butírico e forma irregular das colônias após o crescimento.

A partir do número de grupos exclusivos a cada espécie e o número total de grupos morfológicamente diferentes encontrados no estudo, estimou-se a diversidade populacional de rizóbio para cada espécie.

Tabela 6- Relação do número de grupos totais e exclusivos, morfológicamente diferentes, obtidos de 3 espécies das tribos Phaseoleae e Indigofereae, *V. unguiculata*, *M. atropurpureum* e *I. hirsuta*

Espécies Estudadas	Número de grupos total	Número de grupos exclusivos
<i>V. unguiculata</i>	12	2
<i>M. atropurpureum</i>	14	6
<i>I. hirsuta</i>	10	1

Observando a tabela 2, pode-se inferir a possibilidade de que o siratro reuna maior diversidade de rizóbios capazes de estabelecer simbiose, esta conclusão pode ser tirada por que o siratro apresentou maior número de grupos totais e exclusivos, quando foram agrupados morfológicamente. Seguindo o mesmo raciocínio, aparece o caupi e por último a indigófera. Logo pode-se deduzir a indicação de que a tribo Phaseoleae tenha sido mais promíscua que a Indigofereae. Novamente pode se justificar que a indigófera está naturalmente dispersa na área onde coletou-se o solo e pode ter selecionado uma população.

CONCLUSÕES

1- A área de estudo apresenta uma população de rizóbio bastante diversa, esta diversidade morfológica indica a possibilidade de diversidade genética presente nestes solos;

2- A área do bosque é mais diversa do que as demais, índices de Margalef e Menhinick com valores maiores para esta área;

3- O estudo comparativo de diversidade destes isolados, pode proporcionar a base para estudos que avaliem alterações da diversidade microbiológica, ocorridas no solo ao longo dos anos a partir da retirada da vegetação nativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FUHRMANN, J. *Symbiotic Effectiveness of Indigenous Soybean Bradyrhizobia as Related to Serological, Morphological, Rhizobitoxine, and Hydrogenase Phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.543-549, 1990.*
- JENKINS M.B.; VIRGINIA, R.A.; JARREL, W.M. *Ecology of fastgrowing and slow- growing mesquite - nodulating rhizobia in Chihuahuan and Sonoran desert ecosystems. **Soil Science Society of America Journal, Madison**, v.53, p.543-549, 1989.*
- MAGURRAN, A.E. ***Ecological Diversity and Measurement***. New Jersey: Princeton, 1988. 179p.
- MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; NEVES, M.C.P. *Diversity of Cowpea Nodulating Rhizobia Isolated From the Semi-arid Northeastern region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.67, p.467-471, 1995.*
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. ***Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas***. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 236p.

TAM, I.K.P.; BRONGHTON, W.J. *Rhizobia in tropical legumes - XIII.*

*Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.389-393, 1981.*

VINCENT, J.M. ***A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria.***

Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.