



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

Nº19, Dez. 97, p.1/14



COMUNICADO TÉCNICO

CARACTERÍSTICAS RELATIVAS AO CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA E A MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE “RIZÓBIO”

Lindete Míria Vieira Martins¹, Gustavo Ribeiro Xavier², Maria Cristina Prata Neves³,
Norma Gouvêa Rumjanek⁴

INTRODUÇÃO

As características culturais e morfológicas das espécies bacterianas pertencentes a família Rhizobiaceae e capazes de formar nódulos em leguminosas, genericamente identificadas como rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. Graham (1976) destacou entre várias outras características o tempo de crescimento e reação do pH em meio com extrato de levedura, manitol, sais minerais e agar (YMA) como testes fisiológicos significativos na taxonomia de rizóbio.

As estirpes de rizóbio, inclusive as de crescimento rápido, diferem tanto em quantidade de produção de muco como em qualidade. Normalmente, as colônias de rizóbio são classificadas como mucosas ou molhadas - as que produzem muito muco - e secas as que não produzem muco aparente.

A forma da colônia está diretamente correlacionada com a presença de muco, o que é muito comum no gênero *Bradyrhizobium* (Furhmann, 1990). A consistência do muco produzido é também bastante variada, principalmente nos isolados de crescimento rápido. Enquanto algumas colônias apresentam aspecto gomoso outras são aquosas com o muco chegando a coalescer por toda a placa, dificultando inclusive o isolamento da colônia.

O estudo das características culturais e morfológicas revelam uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos a nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies - principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

¹ Bolsista Pós-graduação, CNPq – Embrapa-Agrobiologia

² Bolsista de Aperfeiçoamento, CNPq - Embrapa-Agrobiologia

³ Bióloga, PhD., Embrapa Agrobiologia, km 47, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970, Seropédica, RJ.

⁴ Farmacêutica, PhD., Embrapa Agrobiologia

Este trabalho teve como objetivo isolar nódulos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) para obter características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio encontrados em solos do semi-árido nordestino.

Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização das estirpes de rizóbio é realizada em meio YMA (Fred & Waksman, 1928) com azul de bromotimol em um pH ideal de 6,8 a 7,0. A caracterização costuma ser realizada a partir do aparecimento de colônias isoladas, durante pelo menos 1 semana.

Os isolados devem também ser cultivados em meio YMA com vermelho congo. O vermelho congo é um corante com propriedades fungicidas e deve ser usado para facilitar a diferenciação entre rizóbio e contaminantes. O rizóbio crescente no meio rico é incapaz de absorver o corante, aparecendo com uma coloração rosada difusa.

As características culturais observadas são: mudança do pH do meio após crescimento bacteriano (avaliada pela alteração de cor do meio de cultura); tempo de crescimento (em dias) de colônias isoladas; diâmetro das colônias (em milímetros), a transparência, forma, borda, produção, consistência e aparência do muco (avaliação visual comparativa) e absorção dos indicadores vermelho congo e azul de bromotimol. Além disso devem ser feitas anotações a respeito de alguma característica especial que o isolado de rizóbio apresente, e que o diferencie portanto, da maioria dos rizóbios caracterizados.

Após a caracterização e purificação, as estirpes devem ser repicadas para tubos de ensaio contendo meio YMA. Após o aparecimento de abundante massa celular, adiciona-se vaselina líquida esterilizada, visando a formação de uma barreira, que impede o fluxo de oxigênio para as culturas estocadas.

Tempo de crescimento

As colônias de estirpes de rizóbio em meio YMA são diferenciadas com base no tempo de crescimento em (a) rápidas - aquelas que produzem crescimento moderado a abundante em até 3 dias, (b) intermediárias, entre 4 a 5 dias, (c) lentas - aquelas que tem pouco crescimento em 6 dias e crescimento moderado em 9 dias e (d) muito lentas - aquelas que crescem a partir de 10 dias. As bactérias que nodulam caupi têm sido consideradas rotineiramente como pertencentes ao grupo *Bradyrhizobium* spp. que compreende um número grande de estirpes de crescimento lento capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas herbáceas, comuns nas regiões tropicais (Jordan, 1984). Entretanto, dentre os isolados obtidos da região semi-árida nordestina, 25% apresentam crescimento rápido em meio de cultura, indicando que o limite das estirpes capazes de nodular o caupi vai além do grupo originalmente definido como *Bradyrhizobium* spp. Sprent (1994) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, porque a habilidade para fixar N₂ não é a maior prioridade para estes microrganismos, mas sim a sua sobrevivência no solo. É possível que as condições específicas desta região tenham propiciado a seleção de uma alta incidência de rizóbio de crescimento rápido.

Corroborando com a hipótese de Sprent (1994), Barnett & Catt (1991) estudaram as características e distribuição de bactérias isoladas de nódulos de raízes de *Acácia* spp., em diferentes localizações geográficas da Austrália, mostrando que os isolados obtidos eram influenciados de forma marcante pela localização geográfica, sendo que os de crescimento rápido foram obtidos somente nos sítios de zonas áridas de Fowler's Gap.

Estes resultados indicam que pode ser esperado um alto grau de rizóbio de crescimento rápido nodulando leguminosas tropicais nativas. Leguminosas nativas australianas tradicionalmente têm sido consideradas semelhantes ao caupi quanto a nodulação por estirpes de *Bradyrhizobium* spp (Bowen 1965; Lange, 1961). Porém, Lawrie (1983) isolou várias estirpes de crescimento rápido a partir delas, o que já havia sido demonstrado por Trinick (1968; 1980), que no entanto considerou que estas estirpes de crescimento rápido não pertencem aos grupos clássicos reconhecidos por inoculação cruzada.

Até que ponto as características que determinam o crescimento rápido e crescimento a altas temperaturas estão associadas geneticamente ainda é assunto para estudos futuros.

Avaliando a diversidade de *Bradyrhizobium* do grupo “caupi” do Oeste da África com base nas características bioquímicas e fisiológicas, Eaglesham et al. (1987) encontraram particularidades comuns para todos ou para a maioria dos isolados, algumas relacionadas à origem geográfica, e outras à morfologia de colônia. Um exemplo claro é a tolerância à temperatura. No Oeste da África o clima se torna quente e seco a medida que aumenta a latitude. Os isolados da localidade de Maradi são significativamente mais tolerantes em relação às temperaturas elevadas e à dessecação (Hartel & Alexander, 1984) do que aqueles das localidades de Ibadan ou Onne. Até então a habilidade de crescer bem a 40°C era uma característica considerada rara entre os rizóbios, mesmo entre aqueles de origem tropical (Bowen & Kennedy, 1959) e por isso o crescimento excelente de muitos dos isolados de Maradi a esta temperatura não era esperado. Num estudo prévio diversos desses isolados não foram capazes de crescer no solo a 40°C (Osa-Afiana & Alexander, 1982).

Segundo Marshall (1964), Bushby & Marshall (1977) e Rensburg & Strijdom (1980) as diferenças de comportamento apresentadas pelas diversas espécies de rizóbio em solos com baixa umidade, se devem a características relacionadas com o tipo de crescimento das bactérias. Em um solo sob dessecação rápida, o rizóbio de crescimento lento sobrevive melhor do que o de crescimento rápido, enquanto que em condições de dessecação lenta ocorre o inverso. Para Lovato (1984), tais observações indicam que os mecanismos de resistência estão ligados a características intrínsecas da estirpe, que se manifestam diferentemente conforme a taxa de perda de água pelas células.

Para Harris (1981), muitos microrganismos são capazes de ajustar seu potencial de água interno para equilibrar a tensão de água do solo pela acumulação compatível de solutos. Van Gestel et al. (1991) mostraram que as bactérias no solo desenvolvem estratégias para sobreviver em condições de estresse. O tipo e estado fisiológico dos microrganismos do solo influenciam sua susceptibilidade para as condições de seca, o que, provavelmente, está relacionado com as diferenças nas propriedades da parede celular. Nesse estudo de população de rizóbio, esses mesmos autores observaram que, em solos de áreas muito secas, a população de crescimento rápido apresenta resistências similares a dos demais microrganismos nativos.

Norris (1965) produziu um esquema para descrever o rizóbio baseado na taxa relativa de crescimento. Ele especulou que estirpes de crescimento rápido são originárias de regiões temperadas, ao passo que estirpes de crescimento lento se originam de regiões do trópico úmido. Este esquema no entanto, não pode ser usado indiscriminadamente. Martins et al. (1997) observaram que a maioria dos isolados de rizóbio que nodulam caupi são tipicamente de crescimento lento e obtidas de região tropical, porém existem várias estirpes de rizóbio de crescimento rápido, que são capazes de nodular tanto caupi quanto soja e são obtidas também de região tropical.

Segundo Tan & Broughton (1981), certas combinações de aminoácidos e açúcares (em geral, glutamina e galactose) promovem uma acidificação do meio após o crescimento de microrganismos de crescimento rápido, ao passo que os microrganismos de crescimento lento alteram o pH do meio para alcalino. Microrganismos de crescimento rápido utilizam mais galactose

durante o crescimento comparado com os de crescimento lento, enquanto que ambos os tipos de rizóbio sintetizam e liberam uma faixa ampla de aminoácidos para o meio de cultura.

Estes mesmos autores sugerem que mudanças no pH por rizóbio, crescido em meio YMA, são causadas pela utilização preferencial de açúcares por organismos de crescimento rápido e de compostos nitrogenados pelos de crescimento lento.

Foram também observados rizóbios de crescimento muito lento, com colônias aparecendo somente após 14 dias (Martins et al., 1997). Esse tipo de crescimento foi encontrado também com isolados de rizóbio de caupi crescidos em campos experimentais de Onne, Ibadan e Maradi por Sinclair & Eaglesham (1984), no Oeste da África. Recentemente foi descrita uma nova espécie *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. capaz de nodular soja, que mostra crescimento muito lento em meio de cultura (Xu et al. 1995).

As características morfológicas e culturais podem estar associadas a parâmetros bioquímicos. Fred et al. (1932) e Graham (1964a) observaram diferenças na utilização de carboidratos por diversas estirpes de rizóbio. Martinez-Drets & Arias (1972) encontraram diferenças enzimáticas entre estirpes rápidas e lentas associadas as mais importantes enzimas das 4 principais vias metabólicas dos carboidratos. Estes autores concluíram que estirpes de crescimento rápido possuem as enzimas correspondentes ao ciclo da hexose monofosfato, enquanto que as de crescimento lento apresentam ausência de atividade de NADP-6 fosfogluconato desidrogenase (6PGD). Por outro lado, Graham (1964b) observou que existem afinidades entre estirpes do grupo de crescimento rápido e grandes diferenças entre esse grupo e o de crescimento lento. Em 1974, Martinez-Drets et al., mostraram também que a utilização de sacarose por estirpes de *Rhizobium* é dependente do tipo de crescimento do rizóbio. As diferenças metabólicas podem ser explicadas pela presença de uma invertase em estirpes de crescimento rápido e *Agrobacterium tumefaciens*, capaz de metabolizar a sacarose pela ausência dessa enzima e da sacarose fosforilase em estirpes de crescimento lento, o que torna inadequado o uso da sacarose para o crescimento de *Bradyrhizobium*. A velocidade de crescimento em meio de cultura seria consequência da existência de uma falha metabólica. Essa caracterização metabólica é importante, uma vez que fornece um método simples na identificação das espécies de rizóbio.

Cerca de 50% de isolados alpinos da área Kosciusko, na Austrália, foram caracterizados como de crescimento muito lento. Estas estirpes foram caracterizadas como do tipo "*Bradyrhizobium*", levando no entanto mais de 14 dias para formar uma colônia de tamanho de 0,5-1,0mm e produzindo colônias compactas, cuja massa celular foi fortemente aderente e difícil de separar, não produzindo quantidades significativas de polissacarídeos extracelulares comuns a maioria das outras estirpes (Barnet & Catt, 1991).

Estirpes de crescimento rápido e lento de rizóbios tem muito pouco em comum, tanto fisiológica como bioquimicamente (Jordan, 1984). Se um grupo representa uma evolução progressiva a partir do outro, ou os dois grupos evoluíram independentemente, é ainda uma questão difícil de responder. Uma teoria propõe que estirpes de crescimento rápido, produtoras de ácido, co-evoluíram com as tribos mais avançadas de leguminosas adaptadas aos solos mais novos e alcalinos das regiões temperadas (Norris, 1965). Estas estirpes foram, inicialmente, descritas como mais evoluídas por causa de sua faixa simbiótica estreita e seu requerimento por pH alto do solo, disponibilidade de nutrientes e carbono. Esta teoria tem sido corroborada pela presença de intermediários evolucionários que possuem características comuns tanto as estirpes de crescimento lento quanto àquelas de crescimento rápido (Tan & Broughton, 1981; Bromfield & Kumar Rao, 1983). Contudo dados de taxonomia numérica sugerem que os dois grupos são muito diferentes entre si (Graham, 1964b). Se a aquisição de características de crescimento rápido é um processo de seleção natural às condições de clima temperado, não existe coerência nas observações que indicam uma maior resistência do rizóbio de crescimento rápido a condições extremas. No entanto a

sobrevivência de bactérias que nodulam raízes pode também ser dependente do pH do solo (Chao & Alexander, 1982), textura (Osa-Afiana & Alexander, 1982), temperatura (Danso & Alexander, 1974), teor de umidade (Boonkerd & Weaver, 1981) e presença de organismos antagonistas (Pugashetti et al., 1982).

Norris (1965) sugeriu que leguminosas que nodulam melhor em condições ácidas se associam, preferencialmente, com rizóbio de crescimento lento, que não produz ácido em meio de cultura, e que as leguminosas adaptadas a pH neutro estão associadas com rizóbio de crescimento rápido, os quais geralmente produzem ácido. Tan & Broughton (1981) também observaram que as estirpes de rizóbio de crescimento rápido normalmente nodulam leguminosas de regiões temperadas e habitam solos neutros ou alcalinos. Martins et al. (1995) mostraram que os isolados que não alteraram o pH do meio (reação neutra) foram mais frequentes nas áreas do Sertão nordestino, onde os solos são geralmente neutros ou alcalinos, do que nas áreas da Zona da Mata onde encontra-se solos mais ácidos. Esta relação foi independente do tempo de crescimento em meio de cultura.

Bioquimicamente, rizóbios de crescimento lento e rápido diferem quanto ao metabolismo e excreção de vários compostos de carbono e nitrogênio. Em termos gerais, os rizóbios de crescimento rápido necessitam menos nitrogênio (tanto na forma NH_4^+ ou de NO_3^-), fósforo e potássio do que os organismos de crescimento lento. Ambas as classes de organismos absorveram mais NH_4^+ do que NO_3^- por célula (Tan & Broughton, 1982). Em relação às fontes de nitrogênio, os organismos de crescimento lento metabolizam mais glutamato e α -ceto glutarato do que os organismos de crescimento rápido, enquanto que o manitol é utilizado do mesmo modo por ambos. Parker (1971); Tan & Broughton (1981) sugeriram que, enquanto rizóbios de crescimento rápido utilizam seletivamente açúcares, os organismos de crescimento lento preferem compostos nitrogenados. As taxas baixas de crescimento apresentadas pelos rizóbios de crescimento lento são decorrentes da menor eficiência destes organismos na utilização da maioria dos substratos. As diferenças bioquímicas observadas não tem sido associadas a fisiologia deste grupo de bactérias.

Alteração no pH do meio de cultura

Os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à alteração de pH produzida no meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. Placas do meio YMA (Fred & Waksman, 1928) recém preparadas com azul de bromotimol, apresentam um pH em torno de 6,8 e cor verde. Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança na cor do indicador para azul, enquanto que os rizóbios de crescimento rápido geralmente acidificam o meio tornando-o amarelo. Tan & Broughton (1981) sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido a utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido seguida de excreção de ácidos orgânicos e, de compostos de nitrogênio pelas estirpes de crescimento lento e consequente liberação de cátions. Esta diferenciação é observada em meio de cultura contendo manitol (Norris, 1965). Ao contrário do esperado, as estirpes produtoras de ácido em meio de cultura não são mais tolerantes a acidez do solo (Norris, 1965) mas, seu crescimento rápido parece conferir uma certa vantagem competitiva na rizosfera devido a maior competição com outros microrganismos.

Martins et al. (1997) isolando rizóbio capaz de nodular caupi, mostrou que a maioria das estirpes seguem tendência típica em relação a alteração do pH do meio, ou seja, as de crescimento rápido acidificam o meio enquanto as de crescimento lento alcalinizam. Foram também observados alguns isolados rápidos e lentos que não alteraram o pH do meio de cultura. Porém, alguns isolados de crescimento lento, acidificaram o meio. Esses isolados provenientes do Sertão possuem colônias

opacas, circulares e muco de consistência butírica. Características divergentes foram observadas para algumas colônias de crescimento rápido que apesar de mostrar uma reação alcalina no início do crescimento, após 7 dias, o meio se tornou ácido. Norris (1965) também descreveu estirpes que podem produzir uma reação alcalina inicial seguida de uma acidificação do meio.

Norris (1965) sugere ainda que esta vantagem competitiva pode ser explicada pela maior ou menor capacidade das estirpes em sobreviverem num determinado pH e cita como exemplo estirpes que isoladas de solos ácidos são capazes de excretar em meio de cultura, substâncias que alcalinizam o meio enquanto que estirpes isoladas de solos alcalinos excretam substâncias que acidificam o meio, o que parece ser um mecanismo de adaptação a condições adversas. Posteriormente, Norris (1965) sugeriu que, se o rizóbio que nodula uma espécie de leguminosa é normalmente produtor de ácido, essa leguminosa deverá nodular com uma faixa estreita de estirpes e de modo geral será dificilmente nodulada em solos ácidos. Halliday (1978) constatou que a produção de ácido ou base é consequência da fonte de carbono e não uma característica intrínseca do rizóbio, o que sugere que o comportamento seja dependente do tipo de solo e quantidade e qualidade de nutrientes disponíveis.

Segundo Stowers & Elkan (1984), a produção de ácido e base em meio YMA pode ser empregada como uma característica geral de taxonomia de rizóbio. Norris (1965) sugeriu que rizóbio produtor de base representa uma forma menos evoluída do que aquele produtor de ácido. De modo geral, o rizóbio produtor de base que apresenta crescimento lento parece ter co-evoluído com leguminosas de origem tropical. Solos tropicais são tipicamente ácidos e é possível que a habilidade de alcalinizar o meio represente uma vantagem seletiva. De acordo com a teoria evolucionária das leguminosas, o rizóbio de crescimento lento representa uma forma ancestral. Enquanto que as estirpes de rizóbio de crescimento rápido, que se associam mais frequentemente com as leguminosas temperadas e são consideradas mais avançadas taxonomicamente, apresentam maior especificidade de hospedeiros.

Parker (1971), Tan & Broughton (1982); Padmanabhan et al. (1990) sugeriram que a preferência por uma fonte particular de carbono e/ou nitrogênio é uma particularidade dependente da estirpe, apesar da tendência geral que acarretou nas mudanças de pH do meio de cultura observadas por Norris (1965). Os rizóbios de crescimento lento apresentam uma maior variação dos padrões de utilização de carboidrato do que os de crescimento rápido. Graham (1964a); Stowers & Elkan (1984) mostraram que os *Bradyrhizobium* prontamente utilizam várias hexoses (galactose, gluconato, glucose e manose). Contudo, entre os rizóbios de crescimento lento, existem exceções a regra. Padmanabhan et al. (1990) encontraram 7 isolados de *Bradyrhizobium* que, dependendo do carboidrato utilizado podem abaixar o pH do meio. Dois isolados, apresentaram este tipo de resposta com 5 diferentes carboidratos. Estes dados sugerem que estirpes de *Bradyrhizobium* spp podem, dependendo das fontes de carbono e/ou nitrogênio, regular o pH do ambiente de acordo com os produtos excretados.

Diâmetro das colônias

O diâmetro das colônias dos isolados que nodulam leguminosas é um parâmetro que pode ser correlacionado com outras características, uma vez que colônias puntiformes apresentam, geralmente, superfície seca ou podem produzir pequenas quantidades de muco. As colônias com diâmetro inferior a 1,0mm costumam ser translúcidas e produzem pouco muco, enquanto que aquelas maiores do que 1,0mm são geralmente produtoras de muito muco. A transparência das colônias com diâmetro maior do que 1,0mm está relacionada ao tipo de muco produzido, desde que muco coalescente geralmente produzem colônias translúcidas.

Segundo Allen & Allen (1950) existe uma correlação entre o tamanho da colônia do rizóbio e suas características na habilidade para fixar nitrogênio simbioticamente. Vincent (1954, 1962) isolou uma estirpe eficaz de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que originou três variantes quanto a quantidade do muco produzido: pouco, médio e muito. Em um estudo envolvendo 17 isolados separados de *Rhizobium* spp., Herridge & Roughley (1975) mostraram que isolados que formaram colônias grandes e mucóides foram simbioticamente ineficientes enquanto os que originaram colônias pequenas e secas foram simbioticamente eficientes. Kuykendall & Elkan (1976) verificaram que colônias de *B. japonicum* do tipo pequeno são de 5 a 10 vezes mais eficientes simbioticamente do que colônias grandes mucóides.

Em contraposição Fuhrmann (1990) encontrou três tipos de colônias de isolados que nodulam soja em YMA: grande e produtora de muco tipo viscoso, grande e com muco aquoso (bastante coalescente) e pequena e seca. Os isolados que produziram colônias grandes e viscosas tenderam a fixar mais N₂ do que os que apresentaram colônia pequena e seca, enquanto que os isolados produtores de colônias grandes e aquosas foram claramente inferiores. Os conteúdos médios de nitrogênio na soja inoculada com as estirpes dos tipos descritos, variaram nas faixas de 49,1 a 86,1 (grande e viscosas); 52,2 a 71,4 (pequena e seca) e 37,4 a 59,4 (grande e aquosa) mg de N por planta.

Herridge & Roughley (1975) encontraram uma relação entre as características de colônias e eficiência simbiótica. Todas as estirpes de tamanho puntiforme com colônias secas, foram muito eficientes; as colônias de tamanho médio apresentaram níveis médios de eficiência, enquanto que isolados de colônias mucóides e grandes eram provenientes de estirpes com baixa eficiência ou completamente ineficientes. Esses autores observaram que muitas culturas de isolados apresentaram 2 ou mais tipos de colônias que, de modo geral, não eram estáveis, o que limita a caracterização.

Transparência e forma das colônias

A transparência é definida pela passagem da luz através da colônia. Os isolados caracterizados no trabalho de Martins et al. (1995) variaram de opacos a translúcidos, onde a colônia compacta não permite a passagem da luz e não evidencia o brilho característico das colônias translúcidas, caracterizadas pela passagem de luz através das mesmas.

O muco coalescente ou aquoso está, de modo geral, associado com colônias translúcidas, enquanto que aquelas com o muco compacto e consistente foram caracterizadas como opacas. Curiosamente, alguns isolados de crescimento lento apresentam uma colônia isolada opaca no centro e borda translúcida.

A forma das colônias isoladas é dependente do dia em que é realizada a caracterização e, principalmente, da consistência do muco produzido, já que elas podem se apresentar de forma circular a irregular dependendo da intensidade da coalescência do muco.

As colônias de forma puntiformes apresentam diâmetro inferior a 1,0 mm. Ao passo que colônias com 1,0 mm de diâmetro geralmente são circulares e não coalescem. A maioria das colônias que variam de 1,0 até 2,0 mm são circulares, porém alguns grupos apresentam a forma irregular. A forma variável caracteriza a maioria das colônias com diâmetro maior do que 2 mm. Dependendo da consistência do muco são observadas dois tipos principais: (1) colônias com muco tipo aquoso que forma colônias circulares no início do crescimento, se tornando irregulares pela coalescência do muco após este período inicial; (2) colônias que produzem quantidade abundante de muco consistente, onde a forma inicial é circular modificando-se, com o passar dos dias, para a forma irregular. Geralmente as estirpes de rizóbio, independente da forma da colônia, possuem a borda lisa ou inteira.

Superfície das colônias

No tocante à superfície, as colônias isoladas normalmente são caracterizadas em secas ou mucóides. Foi observada uma relação entre a superfície das colônias e as regiões de origem dos isolados por Martins (1996). Isolados de superfície mucóide foram encontrados indiscriminadamente em solos do Sertão, Agreste e Zona da Mata da região do Nordeste brasileiro. Porém os isolados de superfície seca, que são uma porcentagem menor do total de isolados, têm uma maior ocorrência nos solos do Sertão, caracterizada pelo clima Semi-Árido.

Eaglesham et al. (1984), estudaram a diversidade das populações de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de caupi de solos de três locais da Nigéria e observaram dois tipos de colônias, secas e mucóides, as quais também se correlacionaram com o solo de origem. O tipo seco, que segundo estes autores são características comuns aos rizóbios de crescimento lento, ocorrem na maioria das vezes no solo com pH mais alto (6,1). A maioria das colônias do tipo úmido ocorreram no solo com pH 5,4. No solo mais ácido (pH 4,1) ocorrem os dois tipos de superfície de colônia indiscriminadamente.

Posteriormente, Eaglesham et al. (1987) estudaram aspectos fisiológicos e bioquímicos da diversidade de *Bradyrhizobium* spp. isolados de nódulos de caupi de três solos do Oeste da África. Eles caracterizaram mais de 100 estirpes de cada uma das 3 localidades através da morfologia de colônias. Neste estudo, foi observado que a superfície das colônias estava positivamente correlacionada com a origem da estirpe. Noventa e sete por cento das estirpes isoladas da localidade de Ibadan produziram muco, enquanto que a maioria das estirpes, obtidas da localidade de Maradi, foram caracterizadas como secas e por fim as estirpes provenientes da localidade de Onne apresentaram uma relação de 60:40 entre mucóides e secas, respectivamente. As colônias mucóides são homogeneamente suspensas em água, enquanto que as secas, formaram uma suspensão heterogênea, indicando que os compostos extracelulares produzidos pelos dois tipos de colônia diferiram tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Um conteúdo maior de componentes hidrofóbicos estão presentes no material extracelular produzido pelas estirpes secas. A preponderância de isolados mucóides de *Bradyrhizobium* em Ibadan sugere uma correlação daquela característica com pH mais baixo, maior precipitação pluviométrica ou menor temperatura.

A ausência da inclusão de estirpes produtoras de muco nas descrições formais de *Bradyrhizobium* (Vincent, 1977; Jordan, 1984) tem sido um problema para os estudos dos microssimbiontes de leguminosas tropicais. Em primeiro lugar, a falta de descrição tem causado sua completa omissão em alguns laboratórios. Era comum o descarte de colônias isoladas que apresentavam produção de muco por serem consideradas contaminantes. O fato da produção de muco estar pobremente representada na literatura, pode estar indicando uma tendência de ignorar ou descartar estas estirpes.

Apesar destas estirpes terem sido inicialmente descartadas, foram depois reconhecidas como superiores as estirpes secas em termos de resistência a condições salinas (Eaglesham et al, 1987), resistência a antibióticos e a acidez do solo (Sinclair & Eaglesham 1984)

Produção, consistência e aparência do muco

Uma grande diversidade é encontrada em relação a produção do muco produzido pelas colônias isoladas de rizóbio. De um modo geral, os isolados que não produzem muco são definidos como secos e os que produzem são caracterizados de acordo com os vários tipos de consistência: viscosa, viscosa de aparência floculosa, pegajosa, gomosa, aquosa e butírica.

A consistência viscosa costuma ser bastante comum. Essa consistência é assim definida pela característica da colônia de grudar na alça de platina. A viscosidade é uma característica de isolados

tanto lentos como rápidos, apresentando variações intrínsecas, como por exemplo pouca, média e muita elasticidade do muco produzido. Algumas estirpes produzem um muco de consistência tão pegajosa que se torna extremamente difícil retirar um inóculo da massa celular. A maioria desses isolados apresentam colônias de cor creme, porém também pode-se observar colônias branco-leitosas.

O muco com consistência viscosa pode apresentar aparências diferentes a depender do tipo de muco definido neste trabalho, floculosa, gomosa, aquosa e leitosa. Em todos os casos, o muco apresenta a característica da elasticidade acrescido de peculiaridades inerentes a cada tipo. Alguns isolados com consistência viscosa apresentam um muco com aparência de leite coalhado que foi definido como tipo floculoso. A colônia apresenta inicialmente forma circular mas aos poucos vai adquirindo forma irregular pela coalescência do muco produzido. As estirpes produtoras de muco floculoso que foram isoladas de caupi onde produziram nódulos eficientes quanto a FBN, foram incapazes de nodular soja (Martins et al 1995).

Os isolados de consistência aquosa são definidos pela capacidade de coalescência do muco que se espalha por toda a placa de Petri, chegando a cair nas tampas das placas que são incubadas de forma invertida. Geralmente, estes isolados possuem colônias translúcidas e confluentes onde as colônias se espalham e se juntam umas às outras. Elas costumam apresentar elevação plana, forma irregular e quantidade de muco variando de médio a abundante.

Ao contrário da característica aquosa, a consistência gomosa é aquela onde a colônia apresenta uma grande quantidade de massa bacteriana e o muco, ao ser tocado, forma um fio dando a impressão de um elástico. Apresenta colônia com elevação e de modo geral, este é um tipo de muco que apresenta dificuldade ao ser manuseado com a alça de platina. Algumas estirpes de rizóbios, sobretudo as de crescimento rápido, apresentam colônias com aspecto bastante gomoso. Em alguns casos, estas colônias gotejam nas tampas das placas, que são incubadas invertidas, diferenciando-se das aquosas por uma quantidade maior de muco produzido, sendo um pouco mais espesso.

Além do muco viscoso produzido por colônias de rizóbio, existe também a produção de muco butírico (semelhante a manteiga). O muco se apresenta consistente, ou seja, não apresenta confluência, formando colônias semelhantes a pérolas, de cor creme, opacas, e sempre convexas.

As estirpes com aparência butírica apresentam grande quantidade de muco. As colônias ao serem manuseadas com a alça de platina, se aderem com facilidade umas às outras formando uma massa compacta semelhante à consistência de gelatina. Em alguns casos esta consistência pegajosa pode ser definida também como uma evolução do tipo viscoso propriamente dita, que se torna pegajosa quando a cultura fica mais velha.

O grupo de isolados de crescimento lento que promovem fixação de nitrogênio em soja compreende estirpes de *B. japonicum* produtoras de muco butírico e de *B. elkanii* produtoras de muco viscoso. De modo geral, os isolados produtores de muco butírico são capazes de acumular taxas maiores de N em soja, como por exemplo a estirpe BR 33. Fuhrmann (1990), considerou a morfologia da colônia um parâmetro bastante útil na previsão da eficiência simbiótica das estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam soja. Os resultados obtidos indicam que outras espécies de crescimento lento além das mencionadas podem estar presente dentre os isolados de rizóbio capazes de nodular a soja.

Idealmente a produção de muco analisada visualmente deve ser feita de forma comparativa com os demais isolados. Na maior parte das estirpes a quantidade de muco produzida coincide com o tempo de crescimento. Martins (1996) observou que as estirpes de crescimento rápido tiveram produção abundante de muco, enquanto que as de crescimento lento apresentaram produção média de muco e as de crescimento muito lento não produziram muco.

Campêlo (1976) também descreveu resultados semelhantes, predominando a produção de muco nas estirpes de crescimento rápido. Tanto isolados de crescimento rápido quanto lentos possuem quantidade e qualidade de muco diversificada, porém no caso dos isolados rápidos, muitas vezes, o isolamento de colônias se torna difícil, uma vez que o muco se espalha rapidamente por toda a placa.

Rizóbio do grupo caupi são nativos de solos tropicais (Ahmad et al. 1981) e tem sido sugerido que a produção de polissacarídeo pode agir como uma barreira protetora contra fatores bióticos e abióticos, possibilitando a sobrevivência e persistência no solo. Hollingsworth et al. (1985) mostraram que estirpes de rizóbio do grupo caupi produtoras de muco viscoso quando crescidas em meio YMA, foram mais resistentes a antibióticos do que estirpes que apresentam colônias secas, encontradas por McLaughlin & Ahmad (1984).

Os isolados provenientes do Semi-Árido nordestino discutidos neste trabalho, foram também, relacionados quanto à resistência a antibióticos de acordo com o tipo de muco produzido. Geralmente as estirpes produtoras de muco apresentam altos níveis de resistência a antibióticos. O muco tipo butírico apareceu em estirpes tolerantes a níveis altos de 8 antibióticos estudados, exceto para a estreptomicina (Martins et al. 1996). O muco apresenta como componentes principais, os carboidratos EPS (exopolissacarídeos) e CPS (polissacarídeo capsular) que interferem na passagem de substâncias para dentro da célula bacteriana. Embora o mecanismo de ação na presença de muco não seja ainda conhecido, é possível que haja alguma proteção contra a assimilação do antibiótico.

Tem sido sugerido que tanto exopolissacarídeos como lipopolissacarídeos possam influenciar o transporte de antibióticos para dentro das bactérias (Nikaido & Nakae, 1979; Chopra & Ball, 1982). Em um estudo sobre diversidade de populações, utilizando a resistência intrínseca a antibióticos, de *Bradyrhizobium* spp., Sinclair & Eaglesham (1984) relacionaram a tolerância a antibiótico com produção de muco, sendo as colônias produtoras de muco mais tolerantes do que as do tipo seco. Já Roughley et al. (1992) não notaram tal correlação, pois entre as colônias examinadas observaram tolerância a antibióticos independente do tipo de muco produzido.

Ramos (1985) comparou a resistência dos isolados a canamicina e cloranfenicol com o tipo de morfologia predominante, e observou que os isolados que apresentaram maior sensibilidade aos antibióticos foram colônias secas ao passo que, nos isolados com resistência a concentrações altas de antibióticos, predominaram as colônias produtoras de muco.

Uma outra característica que tem sido associada a produção de muco é a capacidade de sobrevivência a altas temperaturas. Osa-Afiana & Alexander (1982) mostraram que a habilidade do rizóbio do grupo caupi crescer em altas temperaturas está relacionada com a quantidade de muco produzido pelas estirpes em meio YMA a 28°C. Hollingsworth et al. (1985) encontraram que estirpes de rizóbio do grupo caupi capazes de crescer a temperaturas elevadas (42°C) produziram mais muco a 42°C do que a 30°C. Eaglesham et al. (1987) também encontraram que estirpes produtoras de muco são superiores as estirpes secas em termos de resistência a condições salinas e a antibióticos.

A produção e consistência de muco deve ser considerada, portanto, como uma característica importante para agrupar os isolados de rizóbio podendo ser relacionado com a grande diversidade encontrada para estes microrganismos. No entanto, deve-se ter em mente que as informações sobre consistência de muco são obtidas a partir de meio de cultura, onde o carbono e o nitrogênio não devem estar limitando o crescimento celular. Extrapolações para a fisiologia do rizóbio quando em condições de campo são difíceis e mais informação é necessária sobre a produção de muco nestas condições.

CONCLUSÃO

Este comunicado mostra que é possível estudar a diversidade de rizóbio utilizando como parâmetros características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias.

As maiores diferenças encontradas são relativas a tempo de crescimento associada com a alteração do pH do meio promovida pelas estirpes, à morfologia de colônia e, principalmente ao tipo de muco produzido. A diversidade da morfologia das colônias é uma indicação das diferenças fundamentais entre isolados e pode ser um indício da diversidade genética.

As avaliações descritas são uma ferramenta simples e pouco dispendiosa que permite a caracterização de isolados de leguminosas. No entanto, devido a sua simplicidade é necessário que um grande rigor seja mantido durante toda a observação e que se mantenha um padrão comparativo com estirpes já descritas e classificadas previamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AYANABA, A.; MULONGOY, K.; PULVER, E.L. Examining the potential for inoculant use with cowpea in West African soils. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.58, p.325-335, 1981.
- ALLEN, E.K.; ALLEN, O.N. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. **Botanical Review**, Bronx, v.14, p.273-330, 1950.
- BARNET, Y.M.; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.135, p.109-120, 1991.
- BOONKERD, N.; WEAVER, R.W. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.585-589, 1981.
- BOWEN, G.D. Nodulation of legumes indigenous to Queensland. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.13, p.47-60, 1965.
- BOWEN, G.D.; KENNEDY, M.M. Effect of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.16, p. 177-197, 1959.
- BROMFIELD, E.S.P.; KUMAR RAO, J.V.D.K. Studies on fast and slow growing *Rhizobium* spp. nodulating *Cajanus cajan* and *Cicer arietinum*. **Annals of Applied Biology**, England, v.102, p.485-493, 1983.
- BUSHBY, H.N.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on dessication. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, p.143-147, 1977.
- CAMPÊLO, A.B. **Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais**. Itaguaí: UFRRJ, 1976. 122p. Tese Mestrado.
- CHAO, W.; ALEXANDER, M. Influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.46, p.949-952, 1982.
- CHOPRA, I.; BALL, P. Transport of antibiotics into bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, San Diego, v.23, p.183-240, 1982.
- DANSO, S.K.A.; ALEXANDER, M. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.38, p. 86-89, 1974.

- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M. D.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A.; GOLDMAN, B.J. Patterns of diversity of cowpea-miscellany rhizobia from three West African locations. In: GHAI, B.S. **Symbiotic nitrogen fixation**. Ludhiana: USG, 1984. v.1. p.119-125.
- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. Physiological and Biochemical Aspects of Diversity of *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) from three West African Soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.575-581, 1987.
- FRED, E.B.; BALDAWIN, I.L.; MCCOY, E. **Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants**. Madison: University of Wisconsin, 132p. 1932.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Yeast Extract - Mannitol Agar Laboratory Manual of General Microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145p.
- 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.224-229, 1990.
- GRAHAM, P.H. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.30, p.68-72, 1964a.
- GRAHAM, P.H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General and Microbiology**, London, v.35, p.511-517, 1964b.
- GRAHAM, P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN, P.S., ed. **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**. Cambridge: Cambridge University, 1976. p.99-112. (IBP, 7).
- HALLIDAY, J. **Field responses by tropical pasture legumes to inoculation with Rhizobium**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1978. 10p.
- HARTEL, P.G.; ALEXANDER, M. Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.30, p. 820-823, 1984.
- HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R.J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.38, p.19-27, 1975.
- HARRIS, R.F. Effect of water potencial on microbial growth and activity. In: PARR, J.F.; GARDNER, W.R.; ELLIOTT, L.F., ed. **Water Potential Relations in Soil Microbiology**. Madison: Soil Science Society of America, 1981. p.23-95.
- HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M. H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.142, p.18-20, 1985.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. In: KRIEGD, N.R.; HOLT, J.G., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p.234-256.
- KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.32, p.511-519, 1976.
- LAWRIE, A.C. Relationships among rhizobia from native Australian native legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, p. 1822-1828, 1983.
- LANGE, R.T. Nodule bacteria associated with the indigenous *Leguminosae* of south-western Australia. **Journal of General and Microbiology**, Washington, v.26, p.351-359, 1961.
- LOVATO, P.E. **Sobrevivência e Competição de Estirpes de *Rhizobium phaseoli* em Solo e na Rizosfera de Feijão**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984. 96p. Tese Mestrado.

- MARSHALL, K.C. Survival of root nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.15, p.273-281, 1964.
- MARTINEZ-DRETS, G.; ARIAS, A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.109, p.467-470, 1972.
- 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 (Supl. 3), p.467-471, 1995.
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 213p. Tese Mestrado.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v-29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.
- MCLAUGHLIN, W.; AHMAD, M.H. Intrinsic antibiotic resistance and streptomycin uptake in cowpea rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v.21, p.299-301, 1984.
- NIKAIDO, H.; NAKAE, T. The outer membrane of Gram-negative bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, San Diego, v.20, p.163-250, 1979.
- NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, The Hague, v.22, n.2, p.143-166, 1965.
- OSA-AFIANA, L.O.; ALEXANDER, M. Clays and the survival of *Rhizobium* during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.46, p.285-288, 1982.
- PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in Tropical Legumes: Cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.23-28. 1990.
- PARKER, C.A. The significance of acid and alkali production by rhizobia on laboratory media. In: AUSTRALIAN LEGUME INOCULANTS CONFERENCE, 4., 1971, Canberra.
- PUGASHETTI, B.K.; ANGLE, J.S.; WAGNER, G.H. Soil microorganisms antagonistic toward *Rhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p.45-49, 1982.
- RAMOS, M.L.G. **Influência do calcário e cobertura morta na competitividade e persistência da estirpe CO5 e nas características da população nativa de *Rhizobium phaseoli***. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1985.
- RENSBURG, H.J. van; STRIJDOM, B.W. Survival of fast and slow growing *Rhizobium* spp. under conditions of relatively mild dissection. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.353-356, 1980.
- ROUGHLEY, R.J.; WAHAB, F.A.; SUNDRAM, J. Intrinsic resistance to streptomycin and espectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p.715-719, 1992.
- SINCLAIR, M.J.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p.247-251, 1984.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- STOWERS, M.D.; ELKAN, G.H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.80, p.191-200, 1984.
- TAN, I.K.P.; BROUGHTON, 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.

- TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p.295-299, 1982.
- TRINICK, M.J. Nodulation of tropical legumes. I. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena leucocephala*. **Experimental Agriculture**, London, v.4, p.243-253, 1968.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa spp.*, *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.49, p.39-53, 1980.
- VAN GESTEL, M.; LADD, J.N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.313-322, 1991.
- VINCENT, J.M. The root-nodule bacteria of pasture legumes. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.79, p.4, 1954.
- VINCENT, J.M. Australian studies of the root-nodule bacteria. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.87, p.8, 1962.
- VINCENT, J.M. *Rhizobium*: general microbiology. In: HARDY, R.W.F.; SILVER, W.S., ed. **A Treatise on Dinitrogen Fixation**. New York: John Wiley, 1977. Section 3. p.277-366.
- XU, L.M., GE, C.; CUI, Z.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.45, p.706-711, 1995.