

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE POPULAÇÕES NATIVAS DE RIZÓBIOS DE SOLO DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DE PERNAMBUCO¹

Valéria Nogueira da Silva², Luiz Eduardo de Souza Fernandes da Silva², Márcia do Vale Barreto Figueiredo², Fabíola Gomes de Carvalho³, Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva², Apolino José Nogueira da Silva⁴

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND SELECTION OF NATIVE POPULATIONS OF SOIL RHIZOBIA OF THE SEMI-ARID REGION OF PERNAMBUCO, BRAZIL

The evaluation of native rhizobia strains potential as related to efficiency, competitiveness, and adaptation in regions subjected to high temperature is important to the study of nitrogen symbiotic fixation. The objective of this research was the morphologic characterization of rhizobia isolated from samples of a red yellow argisol of Serra Talhada municipality, Pernambuco State, Brazil, and selection for high temperature and kanamicina and nalidixic acid antibiotics resistance. The study was carried out at Institute of Agricultural Research of Pernambuco (IPA). The isolates were cultivated in YMA media to evaluate colonie characteristics as acidity or alkalinity production, growing velocity, color, shape and transparency, elevation, and mucus production. All isolates were compared to the standard strain *Bradyrhizobium* sp. 6145, recommended for cowpea. The morphological and physiological diversity of the isolates enabled the identification of distinct groups. The isolates 1, 2 and 4 presented higher resistance to high temperature and adaptation to survive in regions subjected to thermal stress periods. The isolate 1 showed the highest resistance to tested antibiotics.

KEY WORDS: rhizobia, morphologic characteristics, high temperature.

INTRODUÇÃO

O crescimento e a produção das leguminosas são, pelo menos em parte, o resultado da interação entre as cultivares das plantas, as estirpes de rizóbio e as condições ambientais em que o sistema simbiótico se desenvolve. Essa interação afeta a assimilação, a

RESUMO

A avaliação do potencial de estirpes nativas de rizóbio em relação à eficiência, competitividade e adaptação às regiões sujeitas à alta temperatura é importante no estudo da fixação simbiótica de nitrogênio. O objetivo do trabalho foi efetuar a caracterização morfológica de isolados de rizóbios a partir de amostras de um argissolo vermelho amarelo do Município de Serra Talhada (PE), e selecioná-los quanto a resistente a alta temperatura e aos antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico. O estudo foi conduzido na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Os isolados foram crescidos em meio YMA e observados: formação de álcali e ácido, tempo de crescimento, cor, transparência, elevação, forma e produção de muco. Todos os isolados foram comparados à estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. 6145, recomendada para o caupi. A diversidade morfológica e fisiológica dos isolados permitiu a obtenção de diferentes grupos. Os isolados 1, 2 e 4 apresentaram maior resistência à temperatura elevada mostrando-se mais adaptados a sobreviver em regiões sujeitas a períodos de estresse térmico. O isolado 1 obteve maior resistência aos antibióticos testados.

PALAVRAS-CHAVE: rizóbio, características morfológicas, alta temperatura.

distribuição e a utilização do carbono e nitrogênio pelas plantas (Neves & Rumjanek 1995).

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma das leguminosas graníferas mais extensamente adaptada, versátil e nutritiva. No Brasil, é cultivada, predominantemente, na região nordeste, representando uma fonte alternativa de proteína. Essa

1. Trabalho recebido em fev./2005 e aceito para publicação em dez./2006 (registro nº 619).

2. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Av. Gal. San Martin, 1371, CEP 50751-000 Recife, PE.

3. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. CEP 59072-970 Natal, RN.

4. Escola Agrícola de Jundiá, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Caixa Postal 07, CEP 59280-000 Macaíba, RN.

E-mail: vnds1@hotmail.com; luizeduardo_404@hotmail.com; mbarreto@elogica.com.br; fgcarvalho@eq.ufrr.br; ajndas@ufmet.br

leguminosa, por associar-se a bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, entre outros, obtém o nitrogênio por simbiose, um processo fisiológico importante, que é explorado para obter aumento no rendimento de grãos de uma maneira ecológica e economicamente sustentável (Vessey 2003). Entretanto, para alcançar uma fixação efetiva do nitrogênio no sistema rizóbio-leguminosa, é necessário selecionar estirpes apropriadas de *Rhizobium* (Pelczar *et al.* 2005).

A fixação biológica de nitrogênio é mediada por ampla gama de microrganismos procariotos com substancial diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Tal diversidade garante a ocorrência desse processo nos mais diferentes habitats terrestres. Contudo, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Moreira & Siqueira 2002).

Muitas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além de inoculação cruzada, taxa de crescimento e produção de álcali ou ácido *in vitro* passaram a ser consideradas, a partir da década de 1940, para a divisão do gênero *Rhizobium* em dois grupos, os de crescimento rápido e os de crescimento lento (Jordan & Allen 1974). Após 1982, os avanços de técnicas moleculares contribuíram para a descrição de seis gêneros, a saber: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium*.

A habilidade das bactérias para fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas é de considerável importância agrícola e tem sido estudada por diversos autores (Silva 2003a, Silva 2003b, Carvalho 2003). No entanto, fatores como temperatura, umidade, resistência a substâncias tóxicas, entre outros, influenciam a eficiência da simbiose. A influência da temperatura no crescimento e desempenho do rizóbio tem sido pouco estudada, apesar de solos tropicais atingirem temperaturas superiores a 40°C nas camadas superficiais, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao processo da fixação simbiótica do nitrogênio nos trópicos (Vargas & Hungria 1997).

Outro fator importante é a capacidade do rizóbio de resistir a antibióticos, permitindo maior performance e colonização do solo. A caracterização das populações com respeito à resistência a antibióticos tem sido usada como técnica viável, em estudos ecológicos da comunidade bacteriana nos solos (Pereira *et al.* 1994).

Devido à existência de uma grande diversidade de espécies nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio, que o fazem em baixo grau de eficiência, é necessária a obtenção de estirpes de rizóbio de alta qualidade, capazes de sobreviver e competir pela fixação eficiente do nitrogênio atmosférico na leguminosa alvo (Figueiredo *et al.* 2001). Neste sentido, é de grande importância a avaliação do potencial de estirpes nativas, com conseqüente seleção das mais adaptadas às regiões de alta temperatura e que apresentem resistência intrínseca a antibióticos.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente diferentes isolados de rizóbios, provenientes do Município de Serra Talhada (PE), e compará-los à estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145, buscando-se selecionar estirpes competitivas e adaptadas à região semi-árida, a serem utilizadas em associação com o feijão caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento das populações nativas de rizóbio foram coletadas amostras de um Argissolo Vermelho Amarelo, no Município de Serra Talhada, região semi-árida do Estado de Pernambuco (latitude 07°59'00"S, longitude 38°19'16"WGr e altitude 500m). Foram utilizados vasos de Leonard, com o substrato areia a pH 6,8, esterilizado por sessenta minutos à temperatura de 120°C e pressão de 101 kPa. O experimento constatou de oito tratamentos, sendo representados pelas diferentes alíquotas, contendo cada um, 10 g de solo, que foram inoculadas em sementes selecionadas e esterilizadas da cultivar IPA-206 de feijão caupi. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, sob delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições, durante 45 dias.

As análises das características morfológicas e fisiológicas foram realizadas no laboratório de Biologia do Solo da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), e o isolamento foi feito segundo a metodologia de Hungria (1994). Foi usada uma estirpe controle *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145.

A caracterização dos isolados de rizóbio foi efetuada em meio de cultura com manitol e extrato de levedura (YMA) mais vermelho congo, incubado por um período de 55 horas, sob 28°C e pH 6,8, conforme descrito por Vincent (1970). Foram feitas as seguintes observações das características morfo-

lógicas: TC- tempo de crescimento (R: rápido, L: lento); CC- cor das colônias (BL: branca/leitosa, T: transparente); TR- transparência (O: opaca, T: translúcida); EL- elevação (C: convexa, A: achatada); FM- formação de muco (A: ausente, P: presente); EM- elasticidade do muco (PF: presença de fio, AF: ausência de fio); FC- forma da colônia (R: redonda, C: cônica).

Para verificação das características fisiológicas, os microrganismos foram repicados em meio com azul de bromotimol, para observação da formação de ácido e álcalis (AC: ácida; AL: alcalina; N: neutra). Os testes de resistência aos antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico foram preparados segundo preconiza Araújo (1994), numa concentração de 12,5 mg.mL⁻¹. As soluções dos antibióticos foram incorporadas ao meio de cultura YMA, ainda líquido, e colocadas em placas de Petri. As culturas testadas cresceram por 55 horas, em tubos de ensaio contendo 4,0 mL de meio TY líquido (Beringer 1974), sendo transferidas aos meios com antibióticos, repicadas com alça de Drigalsky e incubadas a 28°C pelo mesmo período.

Para verificar a resistência à alta temperatura, as bactérias foram repicadas em meio sólido YMA, com indicador vermelho congo, sendo incubadas às temperaturas de 37°C e 39°C, por um período de 55 h.

Os dados de resistência aos antibióticos e às temperaturas elevadas foram submetidos a análise agrupamento, com a opção UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*), baseada no coeficiente de Jaccard. Para isso, utilizou-se o aplicativo computacional NTSYSpc – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão 1.70 (Rohlf 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que concerne à formação de ácido e álcalis, verificou-se que os isolados 1 e 4 apresentaram reação neutra (Tabela 1). Os isolados 2 e 9 acidificaram o meio, enquanto os demais apresentaram reação alcalina. Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, e a maioria das colônias apresentou-se branco leitosa, opacas, com elevação convexa e formas redondas. Apenas para o isolado 2 houve presença de muco com formação de fio.

Todos os isolados apresentaram as características de cor, elevação, transparência e formação de ácido e álcalis compatíveis com as características

Tabela 1. Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios que nodulam caupi.

| Estirpe / Isolados | Características dos isolados ¹ | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | FAA | TC | CC | TR | EL | FC | FM | EM |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. (6145) | Al | L | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 1 | N | R | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 2 | Ac | R | BL | O | C | R | P | PF |
| Isolado 3 | Al | R | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 4 | N | R | T | T | C | R | A | AF |
| Isolado 5 | Al | R | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 6 | Al | R | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 8 | Al | R | BL | O | C | R | A | AF |
| Isolado 9 | Ac | R | BL | O | C | R | A | AF |

¹- FAA - formação de ácido e álcalis (Ac: ácida, Al: alcalina, N: neutra); TC - tempo de crescimento (R: rápido, L: lento); CC - cor das colônias (BL: branca/leitosa, T: transparente); TR - transparência (O: opaca, T: translúcida); EL - elevação (C: convexa); FC - forma das colônias (R: redondas); FM - formação de muco (A: ausente, P: presente); EM - elasticidade do muco (PF: presença de fio, AF: ausência de fio).

descritas por Hungria (1994). Essa diversidade morfológica também foi verificada por Martins *et al.* (1997), estudando as características de 27 isolados de rizóbios de raiz e caule de *Discolobium* sp., nativas do Pantanal Mato-Grossense. Martins *et al.* (2001) observaram uma distinção dos isolados quanto às características de crescimento e reação de pH, ou seja, os isolados de rizóbios que apresentaram crescimento rápido, acidificaram e alcalinizaram o meio YMA, bem como os de crescimento lento.

Segundo Martins (1996), é possível que a habilidade dos rizóbios de alcalinizar o meio represente uma vantagem seletiva. Temperatura e pH do solo são fatores determinantes para o sucesso da estirpe de rizóbio em promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (Neves & Rumjanek 1998).

Quanto à tolerância à temperatura, a Tabela 2 mostra que todos os isolados suportaram a temperatura de 37°C, assim como a estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145. Com relação à temperatura mais elevada (39°C), no entanto, observou-se o crescimento apenas dos isolados 1, 2 e 4. Estes mostraram maior capacidade de sobreviverem em períodos de estresse térmico, relativamente aos outros isolados e à estirpe padrão 6145, que não apresentaram crescimento e mostraram-se suscetíveis à temperatura de 39°C. Silva *et al.* (2000a), trabalhando com a cultura do feijoeiro e 14 isolados do Município de Araripina (PE), observaram que a maioria deles resistiu a temperaturas de 36°C, 38°C e

Tabela 2. Crescimento¹ em alta temperatura dos isolados de rizóbio e estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp.

| Temperatura | Isolados | | | | | | | | <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Semia 6145) |
|-------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 9 | |
| 37°C | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 39°C | +++ | +++ | --- | +++ | --- | --- | --- | --- | --- |

¹ (+) Crescimento; (-) Ausência de crescimento.

Tabela 3. Crescimento¹ em antibióticos dos isolados de rizóbio e estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp.

| Antibiótico | Isolados | | | | | | | | <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Semia 6145) |
|------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 9 | |
| Kanamicina | +++ | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | +++ |
| Ácido Nalidíxico | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

¹ (+) Crescimento; (-) Ausência de crescimento.

40°C, quando comparados com a estirpe padrão *Rhizobium tropici* CIAT 899.

No dendrograma da Figura 1, observa-se que os resultados permitem dividir os isolados em dois grupos: o grupo I, formado pelos isolados 1, 2 e 4, e o grupo II, pelos demais isolados e a estirpe Semia 6145. Os grupos apresentaram, no entanto, um índice de similaridade em torno de 68% em relação à resistência à alta temperatura, quando comparados com a estirpe padrão. Esses isolados, especialmente os do grupo I, revelam-se com grande potencial para a agricultura, por apresentarem maior competitividade em solos do semi-árido de Pernambuco, refletida pela maior resistência a altas temperaturas (Tabela 2). Esses resultados corroboram os encontrados por Silva *et al.* (2000b), que encontraram grupos das populações nativas de rizóbios com um índice de similaridade de 50%, quando testados em relação à resistência à alta temperatura.

No que tange à resistência intrínseca dos isolados aos dois antibióticos, apenas o isolado 1 equiparou-se à estirpe padrão (Tabela 3). Os demais apresentaram-se sensíveis à kanamicina e resistentes ao ácido nalidíxico. Silva (1999) verificou que, de

quatorze isolados de rizóbio estudados, treze foram sensíveis a dosagens mais altas de kanamicina e resistentes ao ácido nalidíxico. Porém, Silva *et al.* (1999) observaram que a maioria dos oito isolados de solo do Município de Santa Maria da Boa Vista (PE) também foi suscetível à kanamicina, embora resistentes a outros antibióticos como clorafenicol e estreptomicina. Xavier *et al.* (1998) comenta que a resistência a níveis de até 140 mg.mL⁻¹ ou mais altos do antibiótico kanamicina, geralmente, não é uma característica comum em grupos de *Bradyrhizobium*.

Segundo Tavares (1986), existe suscetibilidade e resistência natural de rizóbios aos antibióticos, especialmente à kanamicina, pois tais antibióticos são produzidos pelos actinomicetos. De acordo com Pereira (1995), a resistência intrínseca das populações de rizóbios aos antibióticos é determinada por uma série de fatores relacionados às condições ambientais, sendo que os níveis de resistência são acentuadamente influenciados pelo tipo de solo, assim como pelo seu uso e manejo.

O dendrograma da Figura 2 mostra que os isolados e a estirpe padrão foram divididos em dois

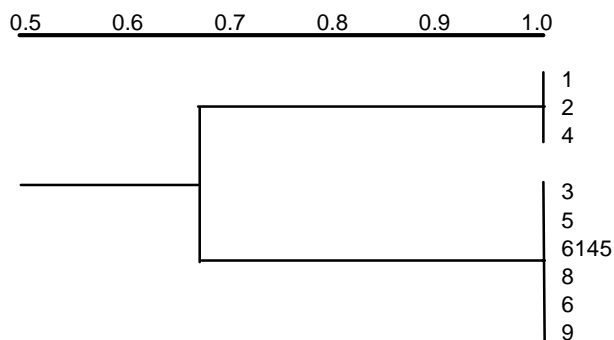


Figura 1. Dendrograma mostrando a relação de similaridade entre os isolados de rizóbio (1 a 9) e uma estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. (Semia 6145), quanto à resistência a temperaturas elevadas.

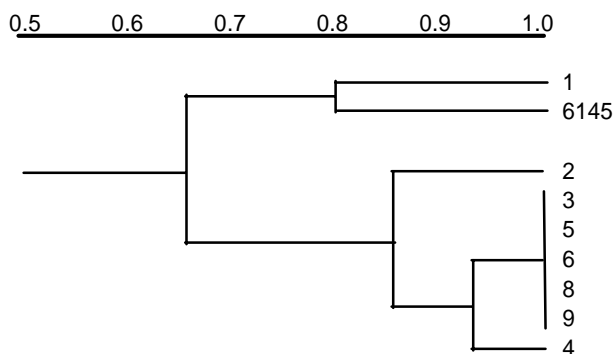


Figura 2. Dendrograma mostrando a relação de similaridade entre os isolados de rizóbio (1 a 9) e uma estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. (Semia 6145), quanto à resistência aos antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico.

grupos, relacionados a um nível de similaridade em torno de 67%. O grupo I, formado pela estirpe padrão e o isolado 1, com 80% de similaridade entre si; e o grupo II, que reúne os demais isolados. O isolado 1 mostrou, portanto, maior probabilidade de comportar-se ecologicamente como a estirpe padrão.

As características morfológicas e fisiológicas de rizóbios fornecem importantes informações para a sua identificação e agrupamento (Jordan 1984). A organização de grupos, experimentalmente, poderá facilitar estudos ecológicos da comunidade bacteriana nos solos, como proposto por Pereira (1983) e Pereira *et al.* (1994). Isso, considerando-se as relações intrínsecas dos organismos com os diferentes tipos de solos e demais condições ambientais, que possam afetar a competitividade e colonização do solo pelos rizóbios.

CONCLUSÕES

1. A diversidade morfológica e fisiológica dos isolados possibilitou a identificação de diferentes grupos, alguns deles com padrões de similaridade próximos à estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145.
2. De modo geral, os isolados de rizóbios apresentaram resistência à temperatura elevada, em especial, os isolados 1, 2 e 4.
3. O isolado 1, além de resistir à temperatura elevada, mostrou-se resistente aos antibióticos kanamicina e ácido nalidíxico. Tais características permitem inferir sobre a sua competitividade e capacidade de fixação de nitrogênio na associação com o feijão caupi, em regiões semi-áridas.

REFERÊNCIAS

- Araújo, R.S. 1994. Geração e análise de mutantes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. p. 227-236. In M. Hungria & R. S. Araújo (Ed.). Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. Embrapa-CNPAP, Brasília, Distrito Federal. 542 p.
- Beringer, J.E.R. 1974. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. Journal of General Microbiology, 84: 188-198.
- Carvalho, F.G. 2003. Variabilidade de Isolados de Estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para cultura da soja. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 104 p.
- Figueiredo, M.V.B., B.N. Egídio & H.A. Burity. 2001. Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. Brazilian Journal of Microbiology, 32: 195-200.
- Hungria, M. 1994. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. p. 45-61. In M. Hungria & R.S. Araújo (Ed.). Manual e métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa-CNPAP, Brasília, Distrito Federal. 542 p.
- Jordan, D.C. & N.O. Allen. 1974. Family III Rhizobiaceae. p. 235-244. In R.E. Buchnan & N.E. Gibbons (Ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore. 256 p.
- Martins, L.M.V. 1996. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 213 p.
- Martins, C.M., M.F. Loureiro, S.M. Souto & A.A. Franco. 1997. Caracterização morfológica e avaliação da tolerância em níveis crescentes de NaCl e altas temperaturas de isolados de rizóbio de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense. Revista Agrícola Tropical, : 7-14.
- Martins, C.M., M.F. Loureiro, S.M. Souto & A.A. Franco. 2001. Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. Revista Agrícola Tropical, 5: 67-79.
- Moreira, F.S.M. & J.O. Siqueira. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 626 p.
- Neves, M.C.P. & N.G. Rumjanek. 1995. Ecologia de rizóbio em climas tropicais. (Série documento). Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. 46 p.
- Neves, M.C.P. & N.G. Rumjanek. 1998. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. p. 15-60. In I. S. Melo & J. L. Azevedo (Ed.). Ecologia microbiana. Embrapa- CNPMA, Jaguariúna. 486 p.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Cham, N.R. Krieg, D.D. Edwards & M.F. Pelczar. 2005. Microbiologia: conceitos e aplicações. Pearson Makron Books, Vol. II, São Paulo. 517 p.
- Pereira, J.C. 1983. Obtenção e avaliação de mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 88 p.
- Pereira, J.C. 1995. Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrados. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro. 193 p.

- Pereira, J. C., C. A. T. Gava & M. C. P. Neves. 1994. Avaliação da resistência natural de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a antibióticos e ao antagonismo promovido por actinomicetos. p. 120. In Simpósio Brasileiro Sobre Microbiologia do Solo, 3. Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, 6. Londrina, Paraná. 172 p. Resumos.
- Rohlf, F.J. 1992. NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. versão 1.70. State University of New York, New York.
- Silva, M.L.R.B. 1999. Caracterização das relações filogenéticas dos isolados de *Rhizobium* sp. (*Phaseolus vulgaris* L.) quando submetidos à temperatura elevada e solo ácido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 140 p.
- Silva, L.E.S.F. 2003a. Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum* sob condições de estresse hídrico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 102 p.
- Silva, V.N. 2003b. Resposta da co-inoculação *Bradyrhizobium* x *Paenibacillus* na nodulação e desenvolvimento do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 90 p.
- Silva, A.F., B.C.T. Paiva, M.C.A. Teles, G.B. Souza, V.N. Silva & H.A. Burity. 1999. Caracterização fisiológica de isolados nativos de rizóbio da região semi-árida de Pernambuco-Brasil. p. 157. In Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo, 14. Temuco, Chile. 382 p. Resumos.
- Silva, F.G., V.N. Silva & M.L.R.B. Silva. 2000a. Caracterização de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro em solo ácido. p. 401-402. In Congresso de Iniciação Científica, 10. Recife, Pernambuco. 651 p. Resumos.
- Silva, M.L.R.B., M.V.B. Figueiredo, H.A. Burity, A.C.E.S. Mergulhão & V.N. Silva. 2000b. Crescimento diferencial de estirpes de rizóbio quando submetido à alta temperatura. p. 83. In Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 7. Recife, Pernambuco. 402 p. Resumos.
- Tavares, W. 1986. Manual de antibióticos para estudantes de medicina. Atheneu, Rio de Janeiro. 236 p.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571-586.
- Vargas, M.A.T. & M. Hungria. 1997. Biologia dos solos dos cerrados. Embrapa-CPAC, Planaltina, DF. 524 p.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for practical study of the root-nodule bacteria. Scientific Publications, Oxford. 164 p.
- Xavier, G.R., S.M.V. Martins, M.C.P. Neves & N.G. Rumjanek. 1998. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*, 27: 446-447.