

RESPOSTA DA CO-INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS e *Bradyrhizobium* sp. EM CAUPI

CO-INOCULATION RESPONSE OF GROWTH PROMOTING BACTERIAS IN PLANTS AND *Bradyrhizobium* sp. IN COWPEA

Artenisa Cerqueira RODRIGUES¹; Jadson Emanuel Lopes ANTUNES²;
Vívian Vieira de MEDEIROS²; Benaia Gonçalves de França BARROS²;
Márcia do Vale Barreto FIGUEIREDO³

1. Engenheira Agrônoma, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE, Brasil. artenisacerqueira@hotmail.com; 2. Bolsistas CNPq/FACEPE do Laboratório de Biologia do Solo - Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA, Recife, PE, Brasil.; 3. Pesquisadora do Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA/DIPAP e Professora membro permanente do Programa de Pós- Graduação em Ciências do Solo- UFRPE, Recife, PE, Brasil.

RESUMO: Para a região árida e semi-árida do Nordeste brasileiro, o cultivo do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) vem se destacando por ser uma cultura adaptável as condições da região. Devido à capacidade do caupi de, em simbiose com o rizóbio, realizar a FBN, a co-inoculação rizóbio e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP's) poderá otimizar a fixação do N₂ atmosférico dependendo da combinação e compatibilidade das estirpes envolvidas. O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta da co-inoculação de BPCP's e *Bradyrhizobium* sp. como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do caupi em condições de casa-de-vegetação. O experimento foi instalado em casa de vegetação, utilizando como substrato areia lavada e autoclavada em vasos de Leonard. Os tratamentos foram: 22 estirpes de BPCP's comparadas com a estirpe padrão (BR 3267), no caupi cv. "IPA 206". A colheita foi efetuada aos 35 dias após o plantio (DAP) e foram avaliados as seguintes variáveis: altura de planta (AP) aos 15, 25 e 35 dias, comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca do nódulo (MSN), nodulação específica (NE) e nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac). Os resultados mostram que a cultura do caupi respondeu significativamente a inoculação de estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* co-inoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267). A interação dos micro-organismos estudados não influenciou as variáveis, nodulação específica e matéria seca dos nódulos no caupi cv. IPA 206. A estirpe de *Paenibacillus graminis* (MC 04.21) co-inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) foi superior em relação às demais estirpes avaliadas na produção de nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea, proporcionando uma melhor performance simbiótica.

PALAVRAS-CHAVE: Simbiose. Fixação de nitrogênio. *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), também conhecido por macassar ou feijão-de-corda, é uma das alternativas de alimento para a população de baixa renda da região Nordeste (NE) do Brasil. Para a região árida e semi-árida do NE brasileiro, o cultivo do caupi vem se destacando por ser uma cultura adaptável as condições da região e de grande importância sócio-econômico principalmente para pequenos e médios produtores, devido à grande tolerância a condições de pouca fertilidade, estresse hídrico e salinidade (FREIRE FILHO et al., 2005).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é reconhecidamente eficiente no caupi que, quando bem nodulado, pode dispensar outras fontes de N e atingir altos níveis de produtividade (RUMJANEK et al., 2005).

O uso de micro-organismos que possam melhorar o processo de nodulação e fixação de nitrogênio é de fundamental importância, pois irá

contribuir para o aumento da produtividade da cultura (HUNGRIA et al., 2000). Os benefícios dos processos ecológicos desempenhados pelas bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP's) têm contribuído para alcançar a sustentabilidade no setor agrícola (FIGUEIREDO et al., 2010).

Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são: aumentos da taxa de germinação, comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, aumento do número de flores e rendimento. As BPCP's biocontroladoras atuam no crescimento, infectividade, virulência e agressividade do patógeno (COMPANT et al. 2010), bem como nos processos de infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução (VAN LOON, 2007).

Devido à capacidade do caupi de, em simbiose com o rizóbio, realizar a FBN, a co-inoculação rizóbio e BPCP's pode proporcionar aumento na nodulação e incrementar a fixação do

N₂ atmosférico, e ainda promover melhorias no crescimento e desenvolvimento de plantas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta da co-inoculação de BPCP's e *Bradyrhizobium* sp. como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do caupi em condições de casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

A estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) foi crescida em duplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido (YM - manitol extrato de levedura, Vincent, 1970) a 200 rpm e 28° C durante 5 dias. As estirpes de bactérias promotoras de crescimento em plantas-BPCP's (*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*) foram crescidas em meio Trypticase soy broth por 24 - 48 horas (200 rpm; 32° C).

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA onde foi efetuada uma avaliação inicial para selecionar, entre 22 estirpes de BPCP's comparada com a estirpe padrão (BR 3267), para avaliar aquela que melhor responda à promoção de crescimento em caupi. As bactérias foram selecionadas utilizando como substrato areia lavada (pH 6,5) em vasos de Leonard, autoclavado por 1 hora, à temperatura de 120° C, a 101 kPa. A cultivar de caupi utilizada foi a "IPA-206". As sementes foram desinfestadas segundo Hungria e Araújo (1994). As concentrações de BPCP's e *Bradyrhizobium* utilizadas foram de 10⁷ e 10⁸ UFC.mL⁻¹, respectivamente.

Cada semente foi inoculada com 1 mL do meio contendo *Bacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus* + 1 mL do meio contendo *Bradyrhizobium* sp. Uma semana após semeadura, foi efetuado o desbaste deixando duas plantas por vaso

Durante o desenvolvimento da planta, a irrigação foi efetuada por capilaridade, utilizando a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada conforme Silveira et al.(1998).

A colheita foi efetuada aos 35 dias após o plantio (DAP) e foram avaliadas as seguintes variáveis: altura de planta (AP) aos 15, 25 e 35 dias, comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca do nódulo (MSN), nodulação específica (NE) e nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac).

O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos inteiramente casualizados com 24 tratamentos representados por 22 BPCP's + uma estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267 -

estirpe padrão) e uma testemunha absoluta (TA) com três repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta, com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 do experimento de viabilidade da co-inoculação BPCP's (*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*) e *Bradyrhizobium* sp. encontram-se as médias das variáveis analisadas, onde os tratamentos apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05), exceto na matéria seca do nódulo (MSN) e nodulação específica (NE).

De acordo com os resultados obtidos, com relação à altura de planta (AP), no momento da primeira avaliação (15 dias) o tratamento que melhor se destacou apresentando valor médio de 24,17 cm foi com o *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) + V 22.32 (*Paenibacillus durus*), já nas avaliações seguintes (25 e 35 dias) o tratamento que apresentou melhores resultados foi o BR 3267 + C 04.50 (*P. durus*), com valores médios de 48 e 120 cm, respectivamente (Figura 1).

O maior comprimento de raiz (CR) foi observado para o tratamento controle (TA) que apresentou valor de 18,4 cm e o menor valor foi encontrado com o tratamento BR 3267+ LMD 24.16 (*P. polymyxa*), apresentando 12,53 cm.

Os demais tratamentos (Tabela 1) apresentaram valores de CR intermediários (~92%) não diferindo estatisticamente dos tratamentos acima mencionados, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O maior desenvolvimento radicular pode contribuir indiretamente para nodulação e fixação de nitrogênio (VESSEY; BUSS, 2002).

Houve diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05), para a variável matéria seca da parte aérea (MSPA), sendo o maior valor observado foi para o tratamento BR 3267 + MC 04.21 (*P. graminis*) (Figura 2), que apresentou um incremento de aproximadamente 67% com relação aos tratamentos BR 3267 + ANBE 31 (*Bacillus* sp.) e de 17,1% com relação a BR 3267 (Figura 3). Isto indica que a co-inoculação com BPCP's influenciou em uma maior produção de biomassa da parte aérea. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, porém aumentaram a MSPA em relação à TA.

Tabela 1. Comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulo (MSN), nodulação específica (NE) e nitrogênio acumulada na matéria seca da parte aérea (Nac) de plantas de caupi co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP's (*Bacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus*).

Tratamentos*	CR (cm)	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MSN (g vaso ⁻¹)	NE (n° nód g MSR ⁻¹)	Nac (mg N vaso ⁻¹)
BR 3267 + 24	16,63 ab	4,09 abc	1,07 abc	0,48 a	113,23 a	140,08 ab
BR 3267 + MC 22.13	13,73 ab	3,57 abc	0,98 abc	0,45 a	156,42 a	119,03 bc
BR 3267 + MC 04.21	13,83 ab	4,86 a	1,20 abc	0,54 a	118,24 a	169,47 a
BR 3267 + CRIP 105	14,80 ab	4,10 abc	1,03 abc	0,53 a	115,27 a	150,56 ab
BR 3267+ LMD 24.10	13,16 ab	4,68 ab	1,91 a	0,55 a	63,59 a	113,73 bc
BR 3267+ LMD 24.16	12,53 b	3,77 abc	1,08 abc	0,47 a	131,37 a	124,35 abc
BR 3267 + PM 04.01	15,66 ab	4,68 ab	1,54 abc	0,54 a	102,95 a	143,30 ab
BR 3267 + POC 115	13,10 ab	4,37 ab	1,18 abc	0,56 a	95,73 a	151,64 ab
BR 3267 + LOUITIT	13,23 ab	4,20 abc	1,34 abc	0,54 a	94,09 a	121,85 abc
BR 3267 + V 22.32	13,70 ab	4,28 abc	1,27 abc	0,55 a	92,03 a	137,00 ab
BR 3267 + ANBE 31	14,56 ab	2,91 c	1,06 abc	0,37 a	98,29 a	82,74 c
BR 3267 + 440	13,50 ab	4,33 ab	1,48 abc	0,59 a	105,44 a	138,01 ab
BR 3267 + 441	15,30 ab	3,38 bc	1,02 abc	0,42 a	151,00 a	110,36 bc
BR 3267 + 444	14,23 ab	3,52 abc	0,70 bc	0,45 a	166,51 a	123,28 abc
BR 3267 + 445	12,96 ab	4,01 abc	1,30 abc	0,55 a	120,57 a	114,49 bc
BR 3267 + 448	16,63 ab	4,02 abc	1,69 ab	0,47 a	62,39 a	113,30 bc
BR 3267 + 447	13,70 ab	4,31 ab	1,09 abc	0,45 a	111,13 a	134,89 ab
BR 3267 + 455	13,66 ab	4,18 abc	0,93 abc	0,52 a	129,53 a	131,91 abc
BR 3267 + 458	14,23 ab	3,57 abc	1,11 abc	0,44 a	100,09 a	111,42 bc
BR 3267 + 462	13,56 ab	4,04 abc	0,90 abc	0,52 a	148,63 a	115,06 bc
BR 3267 + CRIL 156	13,26 ab	3,84 abc	1,06 abc	0,51 a	110,73 a	134,32 ab
BR 3267 + C 04.50	14,23 ab	4,41 ab	1,19 abc	0,54 a	121,46 a	140,96 ab
BR 3267	13,40 ab	4,15 abc	0,89 abc	0,46 a	122,64 a	170,54 a
TA	18,40 a	0,29 d	0,40 c	---	---	4,50 d
CV (%)	12,19	11,25	32,02	16,66	34,30	12,54

Na coluna, médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), *Bacillus* sp. (ANBE 31), *B. cereus* (440), *B. aubitilis* (441), *B. subtilis* (455 e 458), *B. pumilus* (444, 445 e 448), *B. megaterium* (462), *Brevibacillus brevis* (447), *Paenibacillus brasiliensis* (24), *P. kribbensis* (POC 115), *P. macerans* (LMD 24.10), *P. graminis* (MC 04.21, MC 22.13), *P. polymyxa* (LMD 24.16, PM 04.01, LOUITIT) e *P. durus* (CRIL 156, C 04.50, V 22.32, CRIP 105), TA (testemunha absoluta).

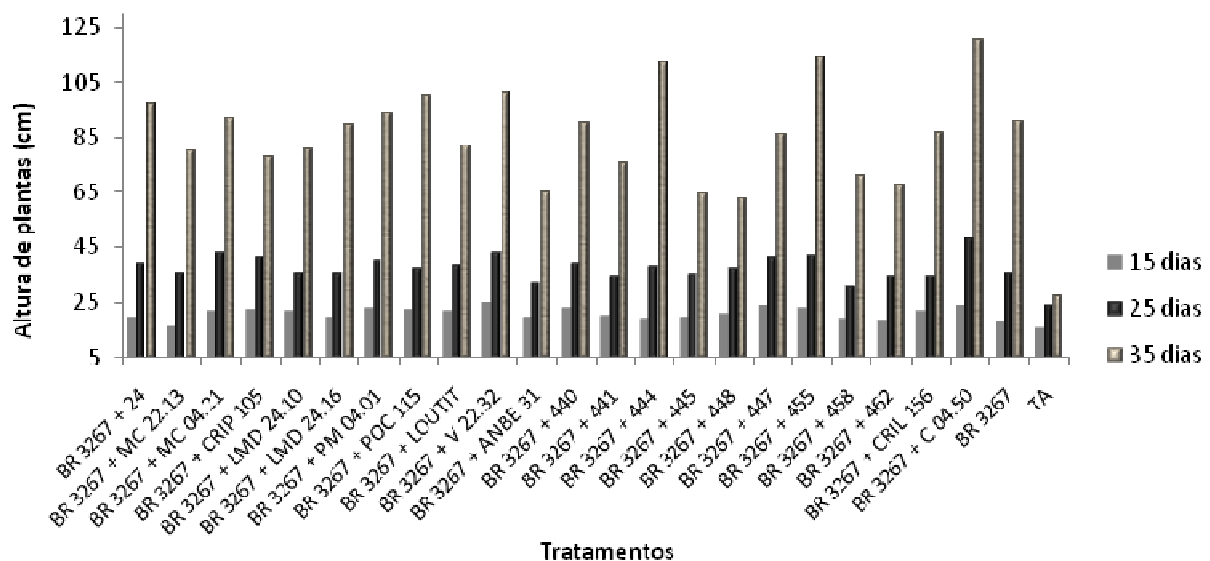


Figura 1. Altura de plantas (AP) de caupi co-inoculadas com co-inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP's (*Bacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus*).



Figura 2. Comparação entre plantas de caupi: testemunha absoluta (A), inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) (B) e co-inoculada com BR 3267+MC 04.21 (*Paenibacillus graminis*) (C).



Figura 3. Comparação entre plantas de caupi: testemunha absoluta (A), inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) (B) e co-inoculada com BR 3267+ANBE 31 (*Bacillus* sp.) (C).

Segundo Araújo (2008), o modo de ação e a própria ocorrência do benefício de BPCP's variam com a espécie de planta e/ou bactéria. Desta forma é importante efetuar estudos para o reconhecimento de mecanismos de ação BPCP's, os quais definirão a melhor utilização das estirpes para cada interação planta-bactéria.

A comparação entre as médias dos tratamentos onde se realizou a co-inoculação (Tabela 1) sinalizou que o tratamento BR3267 +

LMD 24.10 (*P. polymyxa*) apresentou um rendimento de MSR superior ($1,91 \text{ g vaso}^{-1}$) a TA ($0,40 \text{ g vaso}^{-1}$) (Figura 4). A maioria dos tratamentos apresentou valores intermediários de rendimento de MSR, diferindo do tratamento BR 3267 + 444 (*Bacillus pumilus*) que apresentou menor valor ($0,70 \text{ g vaso}^{-1}$) (Figura 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo et al. (2010), na avaliação da co-inoculação rizóbio e *Bacillus* em plantas de caupi.

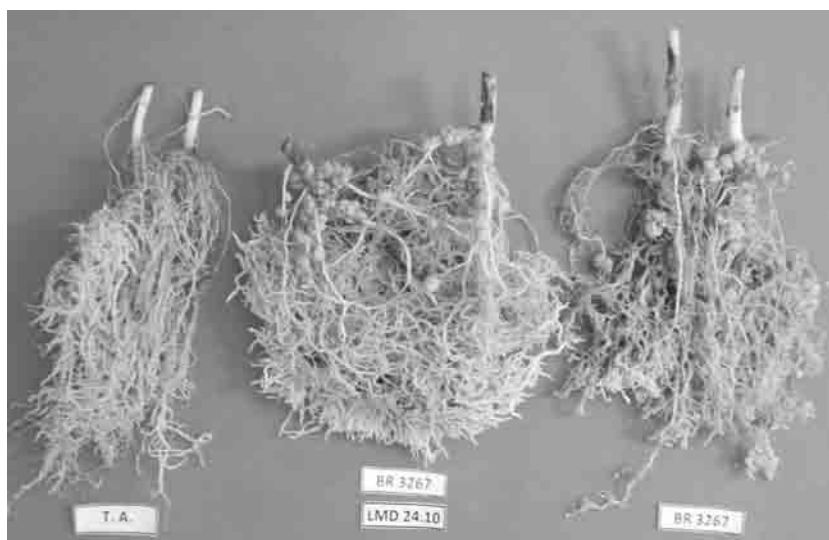


Figura 4. Raízes de plantas de caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e co-inoculadas com BR 3267+LMD 24.10 (*Paenibacillus polymyxa*), comparadas com a testemunha absoluta (TA).

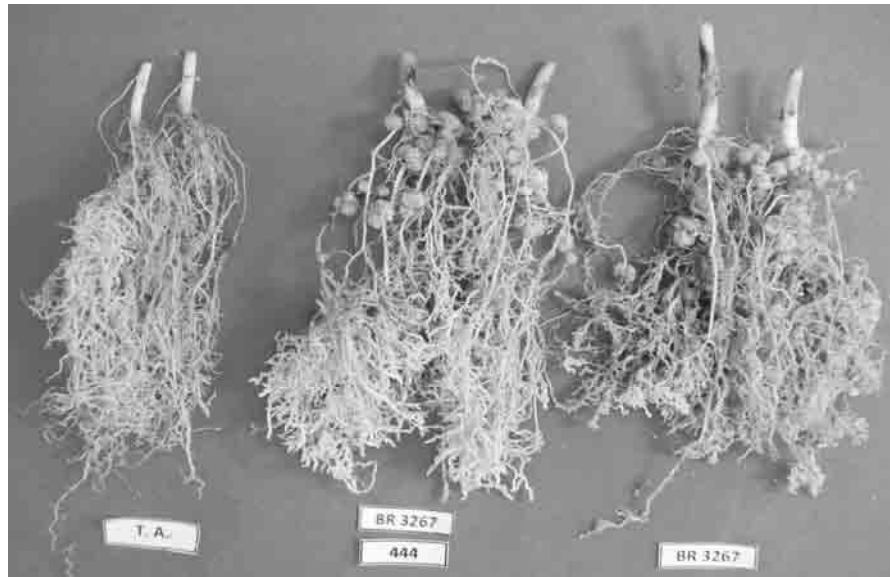


Figura 5. Raízes de plantas de caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e plantas co-inoculadas com BR 3267+444 (*Bacillus pumilus*), comparadas com a testemunha absoluta (TA).

Segundo Sindhu et al. as plantas cultivadas em meio limitado de N, a inoculação com bacilos tem mostrado diminuição do crescimento das raízes de soja e de grama verde, entretanto um aumento do crescimento das raízes foi observado em canola (*Brassica campestris*) (Ghosh et al., 2003). No presente estudo, a natureza promotora de crescimento de raiz no caupi da maioria dos Bacilos foi estabelecida. A ausência de patógenos e de limitação de nutriente (a exceção do N) contribuem para inferir o mecanismo de ação direta dessas BPCP's.

As variáveis matéria seca de nódulos (MSN) e nodulação específica (NE) não apresentaram diferenças significativas entre os demais tratamentos, apresentando valores entre 0,37 a 0,59 g vaso⁻¹ e 62,39 a 166,51 n° nód g MSR⁻¹, respectivamente. Estudos realizados por Figueiredo et al. (2008), com BPCP's e rizóbio apresentou aumento na nodulação e fixação de N₂. A co-inoculação de *Bradyrhizobium* sp. com estirpes de *Bacillus* resultou no aumento da nodulação do caupi.

Para o Nitrogênio acumulado na MSPA (Nac), a co-inoculação com BPCP's e *Bradyrhizobium* sp. não diferiu do tratamento sem co-inoculação (padrão BR 3267) (Tabela 1).

Segundo Catellan (1999), existe um sinergismo entre bactérias promotoras de crescimento em plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas, corroborando assim com os resultados apresentados neste trabalho, onde foi observado um efeito positivo da co-inoculação *Bradyrhizobium* sp. vs BPCP's na AP, MSPA,

MSR, CR e Nac que são variáveis importantes, servindo para garantir um melhor desenvolvimento, e conseqüentemente uma maior produção de grãos.

Atualmente sabe-se que esses micro-organismos exercem muitas funções importantes para a sobrevivência do hospedeiro, por meio de diferentes mecanismos que ainda permanecem obscuros, sabe-se, contudo, que trazem um efeito benéfico à planta e, por esse motivo, são chamadas de Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas. Elas têm sido apontadas como essenciais ao ecossistema de plantas em relação ao suprimento de elementos de crescimento como nitrogênio, fósforo e ferro (Chanway, 1997; Silva et al. 2006), esses efeitos são atribuídos à produção bacteriana de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal (Figueiredo et al. 2008).

CONCLUSÕES

A cultura do caupi respondeu significativamente a inoculação de estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* co-inoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267).

A interação dos micro-organismos estudados não influenciou na nodulação específica e na matéria seca dos nódulos no caupi cv. IPA 206.

A estirpe de *Paenibacillus graminis* (MC 04.21) co-inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) foi superior em relação às demais estirpes avaliadas na produção de nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea, proporcionando uma melhor performance simbiótica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo

financiamento do projeto e ao Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA onde foi desenvolvido o trabalho.

ABSTRACT: In the arid and semi-arid northeastern Brazil, the cultivation of cowpea has stood out for being an adaptable culture conditions in the region. Because of the ability of cowpea, in symbiosis with rhizobia carry out the FBN, the co-inoculation *Rhizobium* and growth promoting bacteria in plants can optimize the fixation of atmospheric N₂ depending on the combination and compatibility of the strains involved. The objective of this study was to evaluate the response of the inoculation BPCP's and *Bradyrhizobium* sp. as an alternative to optimize performance and development of symbiotic cowpea under conditions of green-house. The experiment was conducted in a greenhouse, using as substrate washed and sterilized sand in Leonard jars. The treatments were: 22 strains BPCP's compared with the strain (BR 3267), on cowpea cv. IPA 206. At harvest 35 days after planting (DAP) and the following variables were evaluated: plant height (AP) 15, 25 and 35 days, root length (CR), shoot dry matter (MSPA), root dry matter (MSR), nodule dry matter (MSN), specific nodulation (NE) and nitrogen accumulated in shoots (Nac). The results show that the culture of cowpea responded significantly to inoculation of strains of *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* co-inoculated with the strain of *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267). The interaction of microorganisms studied non-influenced the variables specific nodulation and dry matter of nodules in cowpea cv. IPA 206. The strain of *Paenibacillus graminis* (MC 04/21) co-inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) was higher compared to other strains tested in the production of nitrogen accumulated in shoot dry matter, providing a better performance symbiotic.

KEYWORDS: Symbiosis. Nitrogen Fixation. *Vigna unguiculata*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Co-inoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em -caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p.182-185, 2010.

ARAÚJO, F. F. **Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. Parte II – Micro-organismos Promotores de Crescimento em Plantas.** In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1. ed. Guaíba, Agrolivros. 2008. p. 197-210.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina. EMBRAPA SOJA. 36 p., 1999.

CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Rev. Forest. Sci.**, Bethesda, v. 43, p. 99-112, 1997.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of water stress effects in cammomean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus x Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, p. 182-188, 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World J. Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 1187-1193, 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P. O.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2010. Parte 4, Cap. 1, p. 387-414.

GHOSH, S. et al. Three newly isolated plant growthpromoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiol. Biochem.**, Paris, v. 41, p. 277-281, 2003.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. California Agriculture Experimental Station Circular, 1950. 347 p.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA. 1994.

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, p. 1005–1010, 1997.

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J. L.; RODRIGUES, J. L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 10, p. 19-23, 1998.

SINDHU, S.S. et al. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. **Biol. Plant.**, Prague, v. 45, p. 117-120, 2002.

COMPANT, S. S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 243–254, 2007.

VESSEY, K.; BUSS, T. J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes – Controlled-environment studies. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 82, p. 282–290, 2002.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Pratical Study of Root-Nodule-Bacteria**. Blackwells Scientific Publications. Oxford. 164 p., 1970.