

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE ELISA INDIRETO PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ESTABELECIMENTO DE INOCULANTE RIZOBIANO A PARTIR DE EXTRATOS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

JOSÉ ROBERTO DE ASSIS RIBEIRO¹; NORMA GOUVEA RUMJANEK²

1. Mestre em Biotecnologia Vegetal, Programa de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, jbetous@yahoo.com ; 2. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, norma@cnpab.embrapa.br

RESUMO

A identificação da estirpe de rizóbio formadora do nódulo de leguminosa é uma etapa importante na seleção de inoculantes eficientes e competitivos. Neste trabalho, o método de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indireto foi adaptado de modo a utilizar diretamente o extrato de nódulo, dispensando o cultivo da bactéria e diminuindo o tempo de análise. A purificação do anti-soro com proteína A de *Staphylococcus aureus* permitiu uma redução de cerca de 50% na taxa de reação cruzada. Foram produzidos 12 anti-soros policlonais em coelhos, utilizando como antígeno, isolados de nódulos de caupi e estirpes de referência de espécies de *Bradyrhizobium*. Foi determinado que a estocagem do antígeno (-20° C) diretamente na microplaca, durante uma semana, pode ser realizada sempre que conveniente sem prejuízo para o resultado do teste de ELISA. O tamanho do nódulo é capaz de influenciar o resultado do teste e nódulos grandes apresentam reação mais intensa que os pequenos (<1mm). Porém, os resultados foram confiáveis de acordo com a margem de segurança utilizada, independente do tamanho dos nódulos. A padronização adequada do método de ELISA indireto permite a tipagem de grande quantidade de nódulos proporcionando um subsídio importante para a seleção de inoculantes rizobianos.

Palavras-chave: competitividade, proteína A

ABSTRACT

USE OF INDIRECT ELISA METHOD ON LEGUME NODULE EXTRACTS TO DETERMINE THE RATE OF RHIZOBIAL INOCULANT ESTABLISHMENT

The identification of the rhizobium strain present in a leguminous nodule is an essential step for the selection of efficient and competitive inoculants. In this work, indirect ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) was applied on legume nodule extracts speeding up the strain identification by eliminating bacterial isolation steps from culture media. Anti-serum purification with *Staphylococcus aureus* protein A, reduced 50% of cross-reaction rate. Twelve polyclonal anti-sera were produced in rabbits using as antigen, strains isolated from cowpea nodules and, reference strains of *Bradyrhizobium* species. Storing the nodule antigens directly on the microplate during a week (-20° C) did not interfere with the ELISA results and may be used when convenient. Nodule size influences the test results and large nodules (>1 mm) showed significantly stronger reactions than the small ones. However regardless of size, readings were reliable according to the safety margin used. Method standardization may help on the identification of large nodule number becoming an important subsidy for the rhizobial inoculant selection.

Key words: competitiveness, protein A

INTRODUÇÃO

A seleção de estirpes de rizóbio eficientes tem sido intensivamente pesquisada no Brasil, visando à inoculação de espécies produtoras de grãos, leguminosas forrageiras, adubos verdes e espécies florestais utilizadas na recuperação de áreas degradadas (Dobereiner, 1997). Esta associação eficiente entre

plantas e bactérias do grupo rizóbio é capaz de garantir o crescimento da planta em condições de baixa ou nenhuma adição de fertilizantes nitrogenados, minimizando os custos e evitando a poluição causada tanto pela produção e transporte do fertilizante quanto pelo resíduo do fertilizante no solo.

Entretanto, nem sempre a inoculação da cultura resulta em aumento de produção. Isto ocorre porque

freqüentemente a estirpe inoculada não é capaz de competir com as estirpes nativas, mais adaptadas às condições edafo-climáticas locais. Sprent & Sprent (1990) sugeriram que a colonização dos sítios de infecção é o resultado das interações específicas entre os microrganismos do solo e entre a planta e a estirpe de rizóbio. Desta maneira, além de ser eficiente em relação à fixação biológica de nitrogênio, a estirpe de rizóbio a ser utilizada como inoculante deve também ser capaz de competir com as estirpes nativas (Evans *et al.*, 1996).

A taxa de ocupação dos nódulos em condições de campo é um parâmetro importante nos estudos de competitividade dos inoculantes. Técnicas clássicas são laboriosas e envolvem o isolamento da bactéria em meio de cultura específico, seguido da identificação de características determinadas. A construção de estirpes de rizóbio contendo genes "reporter" é um método de identificação confiável, porém a utilização de microrganismos transgênicos em condições de campo apresenta limitações legais. As técnicas imunológicas reduzem as desvantagens apresentadas pelos métodos anteriores e podem ser utilizadas na identificação de estirpes bacterianas diretamente do nódulo. Dentre as técnicas imunológicas, a reação de aglutinação é bastante utilizada e tem sido realizada a partir de extratos de nódulos. Porém, resultados anteriores obtidos no laboratório de Ecologia Microbiana Molecular da Embrapa Agrobiologia, mostram que a leitura visual da reação é sujeita a erros de interpretação. O método de ELISA, por outro lado, elimina a subjetividade da leitura da reação pela utilização de uma reação cromogênica, que pode ser determinada quantitativamente através da leitura em espectrofotômetro. Este método foi utilizado para identificação de estirpes de rizóbio por Martensson *et al.* (1984), Asanuma *et al.* (1985) e Evans *et al.* (1996).

A técnica de ELISA permite a detecção de pelo menos 10^3 células de rizóbio por mL (Martensson *et al.*, 1984) mas a utilização de soros policlonais apresenta como principal desvantagem a ocorrência de reações cruzadas, diminuindo a confiabilidade do resultado. Técnicas de purificação são utilizadas com sucesso na melhoria da especificidade de anti-soros. Dentre estas, destaca-se a utilização de proteína A extraída de *Staphylococcus aureus* que possui alta afinidade pelas imunoglobulinas da classe IgG, eliminando as IgAs e IgMs responsáveis pela resposta imunológica primária, reconhecidamente inespecífica. Esta estratégia é capaz de reduzir a incidência de reações cruzadas (Schloter *et al.*, 1992; Reis *et al.*, 1997). Evans *et al.* (1996) utilizaram anti-soros purificados com proteína A na identificação da estirpe isolada do nódulo e assim, determinaram a taxa de ocupação nodular do inoculante. O presente estudo teve por objetivo otimizar o método de ELISA indireto com anti-soros purificados com proteína A, utilizando diretamente extrato de nódulo, eliminando-se desta maneira, a etapa de cultivo do rizóbio.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de antígeno: Doze estirpes de rizóbio foram utilizadas para a produção dos antígenos: Nove foram isoladas de nódulos de caupi cultivado em amostras de solo da região Nordeste brasileira e se mostraram eficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio: BR3268, BR3269, BR3271, BR3272, BR3274, BR3275, BR3276, BR3289 e BR3290 e, três são estirpes de referência: BR33 de *Bradyrhizobium japonicum*, BR96 (CB1809) de *B. elkanii* (587) e BR2001 de *Bradyrhizobium* sp. Todas as estirpes com características de crescimento lento foram cultivadas em meio líquido 79 (Fred & Waksman 1928) a 28° C por 5 dias à 120 rpm, exceto a estirpe de crescimento rápido BR3268, que foi cultivada por 3 dias. Após o cultivo, a suspensão de células foi centrifugada (8000g; 10 min) e o precipitado foi lavado duas vezes com água estéril (8000g; 10 min). Quando necessário, as lavagens foram repetidas para remover o excesso de muco. O precipitado foi ressuspenso em água estéril (1 mL) e aquecido (90° C; 30 min) para inativação dos antígenos flagelares, lavado duas vezes com água (8000 g; 10 min), e ressuspenso em água estéril (1 mL) contendo azida sódica 0,02% (p/v). A suspensão antigênica foi estocada à 4° C, e a cada 2 semanas, azida sódica (10 mL; 2 %) foi adicionada para evitar o crescimento de microrganismos.

Produção de anti-soro: Uma suspensão da mistura do antígeno (1 mL), adjuvante de Freund completo (0,5 mL) e adjuvante de Freund completo (0,5 mL) agitada vigorosamente até formar uma emulsão homogênea foi inoculada em coelhos da raça Nova Zelândia com 90 dias de idade. A mistura foi injetada subcutaneamente em 6 locais diferentes na região dorsal do animal. Após 15 dias da primeira inoculação, 7 inoculações subcutâneas da mistura da suspensão de antígeno (0,5 mL) com solução salina estéril (0,5 mL) foram realizadas semanalmente em 2 pontos na região dorsal. O título do anti-soro foi determinado em amostras coletadas antes da primeira, da terceira, quinta e oitava inoculações. Uma semana após a última inoculação, o sangue (50 mL) foi coletado por punção cardíaca com uma seringa de vidro (Carpenter 1975), transferido para um frasco de vidro estéril até a formação do coágulo (2 h; temperatura ambiente). O soro foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta Pasteur e centrifugado (600 g; 10 min; 4° C). O coágulo foi mantido à 4° C durante a noite para que houvesse retração e liberação do soro restante, que foi também coletado. Os anti-soros foram aquecidos a 59° C por 1 hora e estocados (-20° C) em alíquotas de 4 mL (Reis, 1997). Para a sua utilização a alíquota era retirada do estoque e adicionava-se azida sódica para que se obtivesse uma concentração final de 0,02% e mantinha-se a 4° C. O título de cada anti-soro foi determinado por diluições seriadas de 1/100 a 1/51200.

Purificação do anti-soro: Foram utilizadas colunas de agarose com proteína A de *Staphylococcus aureus* da Merck (Afigelâ) contendo 0,2 mL de agarose-proteína

A para os anti-soros BR33, BR96, BR2001, BR3271, BR3289 e BR3290 e, colunas da Pharmacia (HiTrap) contendo 1 mL de agarose-proteína A para os anti-soros BR3268, BR3269, BR3272, BR3274, BR3275 e BR3276. Os anti-soros foram purificados de acordo com as instruções dos fabricantes das colunas. Os anti-soros purificados foram titulados utilizando diluições seriadas de 1/5 a 1/3200.

Obtenção dos nódulos de caupi: Sementes de caupi, desinfestadas superficialmente com etanol (70%) e hipoclorito de sódio, foram semeadas em vasos de Leonard (Vincent, 1982) contendo areia e vermiculita (3:1). As estirpes de rizóbio foram cultivadas em meio líquido 79 (descrito anteriormente). Sete dias após o plantio (dap), as plantas foram inoculadas com as células em suspensão no meio de cultura (2mL). Solução nutritiva isenta de nitrogênio (Vincent, 1970) foi adicionada semanalmente aos vasos (250 mL). Aos 43 dap, as plantas foram coletadas, os nódulos separados das raízes e estocados desidratados em sílica gel até o momento da análise.

Preparação do antígeno nodular para a reação de ELISA: Os nódulos foram rehidratados em água estéril (30 min; temperatura ambiente). Cada nódulo foi colocado em um microtubo. O extrato de nódulo foi obtido através de dois procedimentos: (1) os nódulos foram macerados com bastão de vidro ou (2) esmagados com auxílio de uma pinça (método direto). Os extratos obtidos foram utilizados como antígeno para o teste de ELISA.

Preparação do antígeno bacteriano para a reação de ELISA: Os isolados de rizóbio e as estirpes de referência foram cultivados como já descrito. Após o crescimento, o meio de cultura foi centrifugado (20 min; 8000 g; 4° C), o sobrenadante descartado e as células lavadas três vezes com água estéril e ressuspensas em água estéril (2 mL). A densidade ótica da suspensão de células foi ajustada para 1,0 (540 nm), cerca de 10^8 células por mL. As amostras foram estocadas à 4° C após adição de azida sódica (10ml; 2%).

Teste de ELISA: O teste foi realizado em microplacas (96 poços) de acordo com Reis et al. (1997). Poli-L-lisina, Sigma cat. n. P8920 (50 ml.poco⁻¹; 0,001%) foi adicionada a cada poço, a placa foi incubada (20 min; temperatura ambiente) e cada poço lavado com 200 ml de TBS (tris-HCl, 10 mM; NaCl, 0,15 M; pH 7,3). O antígeno (50 ml.poco⁻¹), descrito anteriormente, foi adicionado à placa que foi incubada (37° C; 30 min) e lavada com TBS (200 ml.poco⁻¹). Nesta etapa, foi testada a interrupção da reação através do que foi denominado estocagem do antígeno, mantendo-se a placa à -20° C durante 1 semana. Em seguida à adição do antígeno, foi adicionada solução de bloqueio (soro albumina bovina 3%, em TBS; 100 ml.poco⁻¹) e a placa incubada (37° C; 30 min). O excesso da solução de bloqueio foi retirado e o anti-soro diluído foi adicionado à placa (50 ml.poco⁻¹) que foi incubada à 37° C por 30 min. O excesso de anti-soro foi retirado e a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (leite em pó desnatado, 0,5%, tween-20 0,05%;

200 ml.poco⁻¹). Anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de coelho conjugada com fosfatase alcalina; 50 ml.poco⁻¹) foi adicionado (37° C; 60 min), seguido de remoção do excesso de anticorpo secundário e lavagem da placa por 5 vezes com solução de lavagem (200 ml.poco⁻¹). O substrato da fosfatase alcalina (p-nitrofenilfosfato; 100 ml.poco⁻¹) foi adicionado (30 min; temperatura ambiente; no escuro). A leitura da cor da reação foi realizada à 405 nm em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeito da estocagem da microplaca após adição do antígeno

A estocagem das placas à -20° C por uma semana após a adição do antígeno resultou em aumento significativo das leituras tanto de reações positivas como negativas. A estocagem pode facilitar a avaliação de um grande número de amostras, reduzindo o tempo despendido nas etapas iniciais. Apesar de Asanuma et al. (1985) concluírem que esta prática pode afetar o resultado final, nas condições descritas neste trabalho, a estocagem não alterou a identificação de reações positivas e negativas (Tabela 1).

Tabela 1- Efeito da estocagem no teste de ELISA realizado com o anti-soro BR33. Os valores representam as leituras da densidade ótica (D.O.)

Tipo de reação	Controle (D.O. ± des.pad.)	Estocagem a -20° C (D.O. ± des.pad.)
positiva	0,61 ± 0,08	0,73 ± 0,07
negativa	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03

Des.pad.: desvio padrão

2. Efeito do tamanho do nódulo

As respostas de ELISA foram determinadas para 2 grupos de nódulos com tamanhos diferentes: nódulos maiores ou menores do que 1 mm. A intensidade da reação de ELISA para o grupo de nódulos maiores foi significativamente maior do que a reação observada para o grupo de nódulos menores (Figura 1). Provavelmente, nódulos jovens apresentam uma quantidade de bacteróides baixa o que acarreta em uma menor quantidade de antígenos disponíveis na placa reconhecidos pelo anti-soro. Estes resultados indicam que o tamanho do nódulo pode afetar o resultado do teste de ELISA. Neste caso, a determinação do valor de leitura mínimo a ser considerado como reação positiva é fundamental garantindo uma margem de segurança da leitura. Asanuma et al. (1985) recomendaram uma margem

de segurança do dobro da leitura do controle negativo, enquanto Olsen *et al.* (1994) sugeriram 15% do controle positivo. Evans *et al.* (1996) classificaram as reações de acordo com a distribuição normal. Neste trabalho, foi adotada como margem de segurança de leitura, 25 % do valor do controle positivo. De acordo com este critério as reações com nódulos pequenos, mesmo com menor

intensidade, foram consideradas positivas (Figura 1). Asanuma *et al.* (1985) não encontraram diferença, em teste de reação de aglutinação, entre nódulos pequenos (1-3 mm) e grandes (4-6 mm). A diferença entre os resultados pode ser consequência do tamanho dos nódulos. Ao contrário de Asanuma *et al.* (1985), neste trabalho foram utilizados também nódulos menores do que 1 mm.

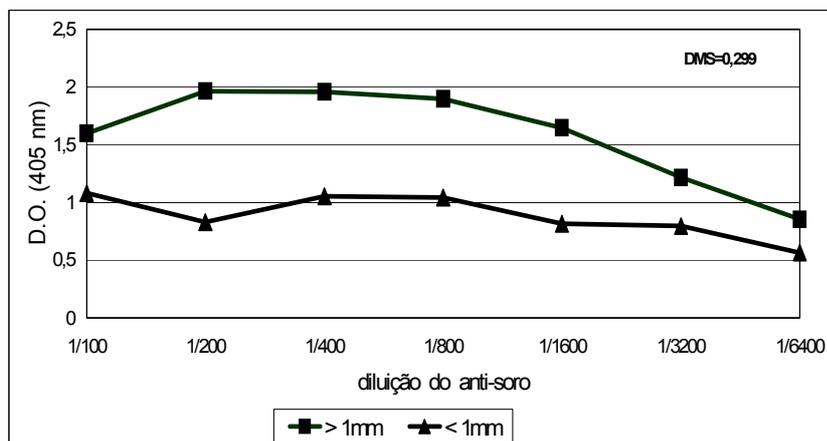


Figura 1- Efeito do tamanho do nódulo na reação de ELISA. Nódulos de caupi formados pela estirpe BR3276 de *Bradyrhizobium* sp.

3. Efeito da preparação do antígeno nodular

O extrato produzido a partir da maceração dos nódulos com bastão de vidro forma uma suspensão turva variando de marrom claro a branco e uma suspensão branca, quando os nódulos foram esmagados com uma pinça (método direto). Não houve diferença significativa entre os resultados positivos e negativos obtidos para ambas as preparações (Tabela 2). A maceração produziu leituras com desvio padrão menor do que o método direto, sugerindo uma melhor homogeneização da amostra e aumentando a precisão do teste.

Tabela 2 - Efeito da preparação do extrato de nódulos (BR33 e BR96) no teste de ELISA. Os valores representam as leituras da densidade ótica (D.O.).

Estirpe	Preparação do extrato de nódulo	
	Maceração (D.O. \pm des.pad.)	Método Direto (D.O. \pm des.pad.)
BR33* ¹	0,73 \pm 0,09	0,68 \pm 0,23
BR96* ²	1,00 \pm 0,13	1,00 \pm 0,20

*¹ 8 repetições. *² 12 repetições; des.pad.: desvio padrão

4. Diferenciação entre a reação do anti-soro com antígenos de suspensão bacteriana e antígenos nodulares

A curva de titulação do anti-soro BR3276 bruto e purificado usando-se antígeno bacteriano e nodular foi semelhante às obtidas para os anti-soros brutos e purificados BR3269, BR3272, BR3274, BR3275 e BR33 e para o anti-soro BR3271 bruto (Figura 2). Neste tipo de curva de titulação, os títulos foram altos o que caracterizou uma alta quantidade de imunoglobulinas. Por outro lado, os anti-soros BR3268, BR3290, BR96 e BR2001 brutos e purificados, assim como o anti-soro BR3271 purificado, apresentaram curvas de titulação semelhante ao anti-soro BR3289 (Figura 3), com título baixo característica de soros com baixa quantidade de imunoglobulinas. Os títulos dos anti-soros nas reações com as células bacterianas ou com os extratos nodulares variaram de 1/100 a 1/12800. A leitura média de D.O.(405 nm) foi igual a 1,13 quando foram usadas células bacterianas e a 0,66 com os extratos nodulares. A redução nos valores de D.O. com o antígeno nodular deve ser consequência da presença de material de origem vegetal, neste antígeno, ocupando sítios de ligação na superfície da microplaca, diminuindo sensivelmente a intensidade da reação do anti-soro contra antígeno bacteriano. Resultados similares foram descritos por Somasegaram *et al.* (1983) e por Asanuma *et al.* (1985), que utilizando reações de aglutinação encontraram redução das reações com antígenos de nódulo se comparadas com reações com células bacterianas de 2 a 6 vezes e de 2 a 3 vezes,

respectivamente. Neste trabalho foi observada uma redução de 40% quando se utilizou o antígeno nodular. Bosch *et al.* 1989 sugeriram que a redução na resposta com antígeno de nódulo foi decorrente da diferença entre

a composição dos antígenos da superfície celular das bactérias de vida livre (antígenos utilizados na inoculação) e dos bacteróides.

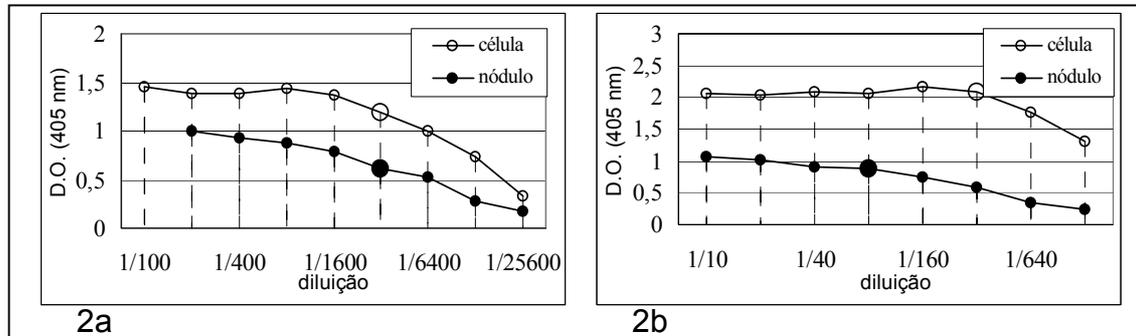


Figura 2 - Titulação do antissoro BR3276 bruto (2a) e purificado (2b) usando extrato de nódulo e suspensão de células bacterianas como antígeno. Os marcadores maiores representam as diluições ideais do antissoro para cada antígeno (reação homóloga).

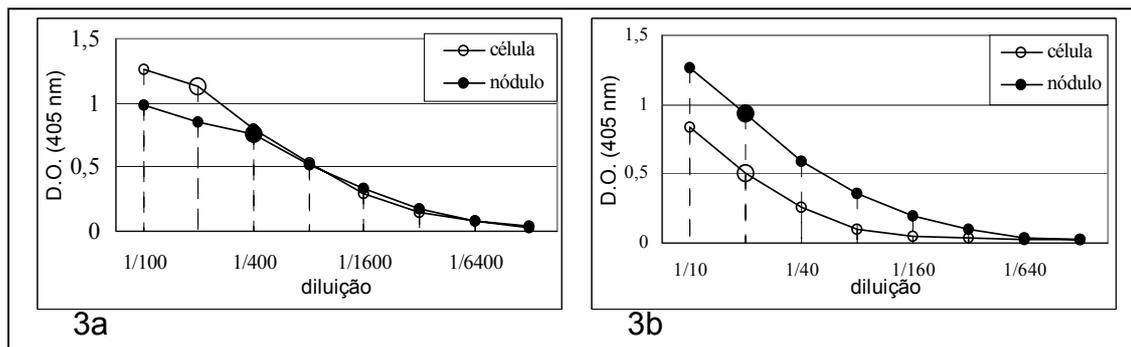


Figura 3 - Titulação do antissoro BR3289 bruto (3a) e purificado (3b) usando-se extrato de nódulo e suspensão de células bacterianas como antígeno. Os marcadores maiores representam as diluições ideais do antissoro para cada antígeno (reação homóloga).

Após a purificação dos anti-soros brutos com proteína A de *S. aureus*, os títulos obtidos variaram de 1/10 a 1/160 quando utilizados os antígenos nodulares (Figuras 2 e 3). Como esperado, as leituras médias de D.O. das reações foram similares às das reações com o soro bruto, uma vez que este parâmetro é dependente da diluição dos antígenos. No entanto, a purificação com proteína A determinou uma redução no título dos anti-soros, através da eliminação das IgA e IgM que são responsáveis pela resposta inespecífica, sendo a intensidade de reação dependente apenas da reação específica.

5. Redução na taxa de reação cruzada após purificação do anti-soro

A tabela 3 mostra o número de reações positivas obtidas com os anti-soros bruto e purificado contra 40

estirpes isoladas de nódulos de caupi e 5 estirpes de referência de rizóbio. A purificação com proteína A diminuiu drasticamente a quantidade de reações cruzadas exceto para os anti-soros BR3269 e BR3276. Foi feita uma diferenciação entre reação cruzada total e reação cruzada extra grupo, onde foram excluídas as reações positivas com as estirpes pertencentes ao mesmo grupo sorológico da estirpe usada para a produção do anti-soro de acordo com Ribeiro (1999). Para 8 dos 10 anti-soros que haviam apresentado reação cruzada, a purificação com proteína A se mostrou eficiente garantindo a redução da maior parte das reações cruzadas extra grupo.

Em média a purificação dos anti-soros com a proteína A reduziu em 50% o total de reações cruzadas (Tabela 3) e, em quase 80% quando foram consideradas apenas as estirpes extragrupo. A redução na taxa de reação cruzada

garante para a maioria dos anti-soros, maior confiabilidade para a determinação do sorogrupo diretamente do nódulo de leguminosa.

O teste de ELISA com soros policlonais purificados utilizado na identificação da estirpe de rizóbio formadora de nódulo é capaz de fornecer resultados mais rápidos e seguro dos que os obtidos por meio de reações de imunoaglutinação. Apesar de ser uma técnica mais complexa, o custo para a identificação de um isolado é relativamente baixo (cerca de US\$ 0,20), apresentando uma relação custo/benefício atrativa mesmo quando

comparada com o método para identificação da bactéria em meio de cultura (cerca de US\$ 0,15). Além do custo acessível, o método proposto possibilita a tipagem de um grande número de nódulos, situação comum em estudos com seleção de inoculantes. A purificação do anti-soro com proteína A de *S. aureus*, reduz em pelo menos 50% a taxa de reação cruzada o que aumenta a confiabilidade do resultado. O sucesso da identificação depende do estabelecimento das condições específicas para cada anti-soro e da padronização rigorosa das condições de execução do teste.

Tabela 3 - Taxa de redução de reação cruzada obtida após a purificação do anti-soro com proteína A de *S. aureus*.

¹Grupo sorológico determinado por Ribeiro (1999); ² Exclusão das reações cruzadas com estirpes pertencentes ao mesmo grupo sorológico da estirpe utilizada para produzir o anti-soro.

AGRADECIMENTOS

A Geraldo Baêta da Cruz e Verônica Massena Reis do Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia pela apoio e esclarecimentos na preparação dos soros e na técnica de ELISA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASANUMA, S., THOTTAPPILLY, G., AYANABA, A., RANGA RAO, V. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of *Rhizobium* both in culture and from nodules of soybean and cowpea. *Can. Journal Microbiol.*, 31: , 1985.
- BOSCH, K. A. V., BREWIN, N. J., KANNENBERG, E. L. Developmental regulation of a *Rhizobium* cell surface antigen during growth of pea root nodules. *Journal Bacteriol.*, 171:4537-4542, 1989.
- CARPENTER, P. L. Immunology and serology. 3ª Ed., Saunders College Publishing, Filadélfia, 1975, 346p..
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.*, 29:771-774, 1997.
- EVANS, J., GREGORY, A., DOBROWOLSKI, N., MORRIS, S. G., O'CONNOR, G. E., WALLACE, C. Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* determined by an indirect, competitive ELISA method. *Soil Biol. Biochem.*, 28:247-255, 1996.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 1928, 145p.
- MÅRTENSSON, A. M., GUSTAFSSON, J. G., LJUNGGREN, H. D. A modified, high sensitive

- enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Rhizobium meliloti* strain identification. *Journal General Microbiol.*, 130:247-253, 1984.
- OLSEN, P., WRIGHT, S., COLLINS, M., RICE, W. Patterns of reactivity between a panel of monoclonal antibodies and forage *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:654-661, 1994.
- REIS, V. M., CRUZ, G. B., FERREIRA, A., FERREIRA, M., FERREIRA, A. C., REIS, F. B., RIBEIRO, J. R. A., SALLES, J. F., WEBER, O. B. Produção e caracterização de soros policlonais para detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997, 9p., (EMBRAPA-CNPAB, Documentos, 30).
- RIBEIRO, J. R. A. *Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de Rhizobium sp. isolados de nódulos de caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp.) originários da região nordeste brasileira.* Tese de mestrado, Programa de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 110 p., 1999.
- SCHLOTTER, M., BODE, W., HARTMANN, A., BEESE, F. Sensitive chemoluminescent-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biol. Biochem.*, 24:399-403, 1992.
- SOMASEGARAM, P., WOOLFENDEN, R., HALLIDAY, J. Suitability of oven-dried root nodules for *Rhizobium* strain identification by immunofluorescence and agglutination. *Journal Appl. Bacteriol.*, 55: 253-261, 1983.
- SPRENT, J. I., SPRENT, P. Nitrogen fixing organism. Pure and applied aspects. 2ª Ed., Chapman and Hall, 1990, 256p.
- VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme (IPB) Handbook, n.15, Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, 1970, 164p.
- VINCENT, J. M. The basic serology of rhizobia. Nitrogen Fixation in Legumes, VINCENT, J. M., Academic Press Australia, 1982.