

Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações

Fatima Maria de Souza Moreira^{1*}, Krisle da Silva^{1,2}, Rafaela Simão Abrahão Nóbrega³, Fernanda de Carvalho¹

¹Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

²Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio, Londrina, PR, Brasil

³Campus "Prof. Cinobelina Elvas", Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, PI, Brasil

Resumo

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, que são denominados diazotróficos. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associados às plantas, sendo neste último caso denominados de diazotróficas associativas. As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros. Esta revisão aborda os diferentes gêneros de diazotróficos associativos e discute aspectos relacionados à taxonomia, ecologia e processos de promoção do crescimento vegetal e ainda como as alterações dos ecossistemas atuam na diversidade e densidade destas bactérias.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, agricultura, inoculantes

Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications

Abstract

Biological nitrogen fixation (BNF) is carried out by representatives of various bacterial phylogenetic groups named diazotrophs. These bacteria can live free in many ecosystems and/or establishing symbiosis or associations with diverse plant species. These last ones are called associative diazotrophs. Associative diazotrophic bacteria can contribute to plant growth by improving N-nutrition as well as by other processes like hormone production, phosphate solubilization, biological control, among others. This review presents different genera of associative diazotrophs regarding their taxonomic position, ecological features and process they mediated related to plant growth promotion. It also shows how modifications in ecosystems influence density and diversity of these bacteria.

Keywords: biological nitrogen fixation, plant growth promoting rhizobacteria, agriculture, inoculants

Introdução

Diversos processos são mediados por microrganismos do solo desempenhando papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, naturais ou manejados.

Os diazotróficos compreendem ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats terrestres (Moreira & Siqueira, 2006).

A perda de diversidade de microrganismos do solo, principalmente dos diazotróficos, pode alterar a estrutura populacional de outros organismos situados ao longo da cadeia trófica. Processos vitais do solo como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, podem sofrer impactos levando o sistema agrícola à maior dependência por fertilizantes. Neste contexto, o conhecimento da diversidade fenotípica e estrutura genética das populações presentes na rizosfera podem auxiliar na compreensão de como as variações no ambiente podem estar influenciando na funcionalidade destas populações.

Espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola como: gramíneas e palmeiras (Magalhães & Döbereiner, 1984; Döbereiner, 1992; Baldani et al., 1997; Fernandes et al., 2001; Sala et al., 2005), orquídeas (Lange & Moreira, 2002), tubérculos (Paula, 1992; Balota, et al., 1997; 1999), cafeeiros (Jiménez-Salgado et al., 1997; Santos et al., 2001), araucárias (Neroni & Cardoso, 2007) e fruteiras (Rao, 1983; Weber et al., 1999). Há relatos também de ocorrência em solos contaminados com metais pesados (Moreira et al., 2008), em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólido industrial (Melloni et al., 2000), em áreas sob reabilitação de bauxita (Melloni et al., 2004; Nóbrega et al., 2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (Silva, 2006).

A FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 é inativada, quando submetida a presença de amônio (Rudnik et al., 1997). Em

áreas não perturbadas, com vegetação clímax, esse processo biológico é pouco estimulado, pois a ciclagem eficiente garante a manutenção do metabolismo e da taxa de crescimento. Já em áreas degradadas em solos e substratos pobres ou desprovidos de matéria orgânica como os de áreas mineradas, a FBN pode ser estimulada.

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como o ácido indol acético, entre outros. Assim, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV); e assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros. De qualquer modo, deve-se admitir que eficiência similar a das simbioses rizóbio-leguminosas no solo não pode ser alcançada. Isto se deve ao fato que mesmo as bactérias associativas estando localizadas no interior das plantas, não há evidências de relação tão complexa e organizada quanto à presente nas simbioses de bactérias nodulíferas com leguminosas que é resultante de um processo muito mais evoluído que minimiza perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico. No entanto, cálculos da contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 kg N/ha/ano o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, entre outras, são a principal fonte de carboidrato da dieta humana e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de FBN, mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção o que justifica estudos visando seu manejo. No entanto, os sistemas agrícolas atuais são na maioria dependentes de insumos industrializados (como adubos nitrogenados) e não exploram o grande potencial dos diazotróficos, tanto para a FBN quanto para outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

Diversidade Taxonômica e Funcional

Bactérias diazotróficas representam um componente importante no suprimento de N em diversos ecossistemas e, principalmente, as simbióticas, denominadas vulgarmente de rizóbio têm sido muito pesquisadas em todo mundo. No Brasil a pesquisa sobre diazotróficos e a sua importância para a FBN em gramíneas foi iniciada há mais de 40 anos pela pesquisadora Johanna Döbereiner. Seu primeiro trabalho com bactérias diazotróficas foi em 1953 no qual relatou pela primeira vez a ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos. Até então já se conhecia o potencial de espécies deste gênero em fixar nitrogênio atmosférico,

porém só haviam sido isoladas em solos do continente Europeu e Asiático. Cinco anos mais tarde Döbereiner & Ruschel, (1958) isolaram e descreveram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana de açúcar em solos tropicais, demonstrando o potencial dos diazotróficos em se associarem com gramíneas. Em 1975 Döbereiner & Day descobriram a capacidade de FBN no gênero *Spirillum* posteriormente nomeado para *Azospirillum* (Tarrand et al., 1978). A partir daí diversas espécies de diazotróficos foram descobertas, tanto de vida livre (eg. *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Dexia* spp., *Paenebacillus azotofixans*) como associativos (*Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) e endofíticos (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) A Tabela 1 apresenta várias espécies de diazotróficos descritas desde então.

A contribuição da fixação biológica de N₂ associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais. Tem-se verificado que áreas de pastagem com gramíneas e cana-de-açúcar têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que indica que este fenômeno poderia estar relacionado com a contribuição da FBN, por microrganismos endofíticos.

Experimentos conduzidos pelo método de incorporação do ¹⁵N confirmaram que várias gramíneas tropicais se beneficiam de nitrogênio fixado biologicamente (De-Polli, 1975; Ruschel, 1975; De-Polli et al., 1977). Estimativas da FBN em gramíneas como *Brachiaria decumbens* e *B. humidicola*, as quais são muito utilizadas para a revegetação de áreas degradadas, indicam valores de 30 a 45 Kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, respectivamente advindo da FBN (Boddey & Victoria, 1986). Isto exemplifica a contribuição da associação gramínea-diazotróficos, na incorporação de N no solo e reforça a importância da FBN na recuperação de áreas degradadas. Nesse contexto, a interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o uso de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais.

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é ferramenta útil para o conhecimento da diversidade destes organismos. O sequenciamento de genes que codificam para o RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para estudos de diversidade. Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem

Tabela 1. Ocorrência de diazotróficos associativos.

Espécie de diazotrófico	Habitat (Referência)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Coqueiro, ficus, milho, mangueira, eucaliptos, leguminosas, gramíneas, laranjeiras, pinheiros e outras espécies não identificadas (Döbereiner, 1953)
<i>Azorhizophilus</i> (syn. <i>Azotobacter</i>) <i>paspali</i>	<i>Paspalum notatum</i> (Döbereiner, 1966)
<i>Azospirillum brasiliense</i> / <i>A. lipoferum</i>	Milho, arroz, sorgo, trigo, cevada, <i>Miscanthus sinensis</i> , <i>Panicum maximum</i> , <i>Brachiaria mutica</i> , <i>Pennisetum purpureum</i> (Döbereiner & Pedrosa, 1987)
<i>A. amazonense</i>	<i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Digitaria</i> sp., <i>Azonopus</i> sp., <i>Panicum pilosum</i> , <i>Paspalum virgatum</i> , <i>Manihot utilisima</i> , <i>Digitaria decumbens</i> , <i>Hypanthia rufa</i> , <i>Pennisetum purpureum</i> (Magalhães et al., 1983); <i>Eichornia crassipes</i> , <i>Echinochloa polistachya</i> , <i>Leptochloa scabra</i> , <i>Panicum boliviense</i> , <i>Paspalum repens</i> , <i>Sorghum arundinaceum</i> , <i>Brachiaria humidicola</i> , <i>Bactris gasipaes</i> (pupunha) (Magalhães & Döbereiner, 1984); Orquídeas (várias espécies), tomate, trigo, milho, couve, cana de açúcar, dendê, <i>Paspalum notatum</i> , <i>Bambusa vulgaris</i> (bambu), <i>Coffea arabica</i> , <i>Brachiaria decumbens</i> , <i>Pennisetum purpureum</i> , <i>Eucalyptus grandis</i> , (Lange & Moreira, 2002); Milho, sorgo, arroz (Baldani et al., 1984)
<i>A. halopraeferans</i>	<i>Leptochloa fusca</i> (Reinhold et al., 1987)
<i>A. irakense</i>	Arroz (Khammas et al., 1989)
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Miscanthus</i> spp. (Eckert et al., 2001)
<i>A. oryzae</i>	Arroz (Xie & Yokota, 2005)
<i>A. mellis</i>	<i>Melinis minutiflora</i> (Peng et al., 2006)
<i>A. canadense</i>	Milho (Mehnaz et al., 2007a)
<i>A. zeae</i>	Milho (Mehnaz et al., 2007b)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Arroz (You et al., 1988)
<i>Azocarcus indigenus</i> , <i>A. communis</i>	<i>Leptochloa fusca</i> (Reinhold-Hurek et al., 1993)
<i>Paenibacillus durus</i> (syn. <i>Bacillus azotofixans</i>)	gramíneas (Seldin et al., 1984, 1985)
<i>Bacillus</i> spp.	Trigo (Neal & Larson, 1976)
<i>Bacillus megaterium</i>	(de Bary, 1884)
<i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i>	Arroz (Dafonchio et al., 1998; Xie et al., 1998)
<i>Paenibacillus brasiliensis</i>	Milho (von der Weid et al., 2002)
<i>Beijerinckia fluminensis</i>	Milho, cana de açúcar, <i>Citrus</i> sp., seringueira (Döbereiner & Ruschel, 1958)
<i>Beijerinckia</i> spp.	cana-de-açúcar (Döbereiner, 1961; Ruschel, 1975); <i>Bactris gasipaes</i> , (Magalhães & Döbereiner, 1984)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Arroz (Gillis et al., 1995)
<i>B. kururiiensis</i> (syn. <i>B. brasiliensis</i>)	Arroz, mandioca, batata-doce e cana-de-açúcar (Baldani et al., 1997); Banana, abacaxi (Cruz et al., 2001)
<i>B. tropica</i> (syn. <i>B. tropicalis</i>)	Cana de açúcar, milho, teosinto (Reis et al., 2004); Banana, abacaxi (Cruz et al., 2001)
<i>B. unamae</i>	Milho, cana de açúcar, café (Caballero-Mellado et al., 2004)
<i>B. silvaticola</i>	Milho, cana de açúcar (Perin et al., 2006)
<i>B. terrae</i>	Solos de florestas (Yang et al., 2006)
<i>B. ginsengisoli</i>	Campo de ginseng (Kim et al., 2006)
<i>Arcobacter</i> (syn. <i>Campylobacter</i>) <i>nitrofigis</i>	<i>Oriza perenne</i> , <i>Spartina alterniflora</i> (McClung & Patriquin, 1980; McClung et al., 1983)
<i>Dexia</i> spp.	Espécies de: gramíneas, Cyperaceae, Onagraceae, Compositae e Leguminosae (Campêlo & Döbereiner, 1970); <i>Oriza perenne</i> (Magalhães, 1981)
<i>Enterobacter</i> spp. (agglomerans, cloacae, aerogenes)	Gramíneas, trigo, cevada, arroz (Korhonen et al., 1989); Coqueiro (Fernandes et al., 2001)
<i>Gluconacetobacter</i> (syn. <i>Acetobacter</i>) <i>diazotrophicus</i>	Cana de açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988); Abacaxi (Tapia-Hernandez et al., 2000)
<i>Gluconacetobacter johannae</i> , <i>G. azotocaptans</i>	Batata doce (Ipomoea batatas) (Paula et al., 1991)
<i>Herbaspirillum seropediccae</i>	<i>Coffea arabica</i> (café) (Fuentes-Ramirez et al., 2001)
<i>Herbaspirillum</i> (syn. <i>Pseudomonas</i>) <i>rubrisubalbicans</i>	Arroz, sorgo, milho (Baldani et al., 1986); Sorgo, cana de açúcar, <i>Pennisetum purpureum</i> , <i>Brachiaria decumbens</i> , <i>Digitaria decumbens</i> , <i>Melinis multiflora</i> (Baldani et al., 1992)
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	Banana (Cruz et al., 2001)
<i>Klebsiella</i> spp. (<i>K. planticola</i> , <i>K. oxytoca</i>)	Cana de açúcar (Baldani et al., 1992); Banana, abacaxi (Cruz et al., 2001)
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Spartina pectinata</i> , <i>Miscanthus</i> spp., <i>Pennisetum purpureum</i> (Kirchhof et al., 2001)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Arroz (You et al., 1986)
	Arroz (Barraquio et al., 1983; Watanabe et al., 1984); Coqueiro (Fernandes et al., 2001)
	Coqueiro (Fernandes et al., 2001)

influência por mudanças no meio ambiente. Atualmente, o gene 16S rDNA é o mais utilizado para inferir a respeito das relações filogenéticas entre bactérias (Woese, 1991). Os resultados obtidos com o sequenciamento do 16S rDNA pode ser comparado com outras seqüências depositadas em bancos de dados como NCBI (National Center of Biological Information/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). No entanto, outras características culturais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas são utilizadas para avaliar a diversidade, como as que constam na descrição das espécies listadas a seguir.

Gêneros de bactérias associativas

Gênero *Azotobacter*

O gênero *Azotobacter* (Beijerinck, 1901) pertence à classe γ -proteobacteria e a família Azotobacteriaceae, e foi juntamente com o gênero *Beijerinckia* os percussores em estudos de bactérias diazotróficas associativas. Sua ocorrência em solos brasileiros foi detectado em 1953 pela pesquisadora Johanna Döbereiner.

Atualmente estão descritas oito espécies sendo estas: *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck, 1901), *A. vinelandii* Lipman (1903), *A. beijerinckii* Lipman (1904), *A. nigricans*, Krasil'nikov (1949), *A. macrocytogenes* (Jensen, 1955), *A. paspali* (Döbereiner, 1966) e *A. armeniacus* (Thompson & Skerman, 1981), *A. salinestrus* (Page & Shivprasad, 1991). Dentre estas espécies as mais comuns são *A. chroococcum*, *A. vinelandii* e *A. paspali*, sendo esta última a mais estudada ecologicamente (Döbereiner et al., 1995). A *A. paspali* apresenta uma associação bastante específica com a gramínea *Paspalum notatum* (Döbereiner, 1966). Em um estudo mais detalhado da ocorrência desta bactéria diazotrófica em outras cultivares de *Paspalum* (*P. plicatum*, *P. dilatatum*, *P. vergatum*) pode-se confirmar a estreita associação com o ecotipo *P. notatum* (Döbereiner, 1970). Döbereiner (1966) ainda ressalta que a especificidade de um *Azotobacter* para a rizosfera de uma planta sugere relações mais íntimas entre planta e bactéria do que as conhecidas nas outras espécies de diazotróficos associativos na rizosfera de plantas (eg. *Beijerinckia* em rizosfera de cana-de-açúcar). Boddey et al. (1983) utilizando a técnica de diluição do ^{15}N demonstrou que a contribuição da fixação biológica de nitrogênio de *A. paspali* em *Paspalum notatum* é de 20kg/ha/ano.

Gênero *Beijerinckia*

Pertencente a classe α -proteobacteria o gênero *Beijerinckia* (Derx, 1950) tem sido encontrado em solos de clima tropical, subtropical e temperado, assim como em regiões polares (Döbereiner et al., 1995). Atualmente possui 5 espécies descritas: *Beijerinckia indica* (Starkey & De 1939), *Beijerinckia mobilis* (Derx, 1950),

Beijerinckia dextrii (Tchan, 1957), *Beijerinckia fluminensis* (Döbereiner & Ruschel 1958), e *Beijerinckia doebereineriae* (Oggerin et al., 2009). *Beijerinckia doebereineriae* (Oggerin et al., 2009) foi proposta segundo análise de seqüências do 16S rRNA de estirpes de *Beijerinckia fluminensis*. O isolado LMG 2819 foi caracterizado e verificou-se que suas propriedades não concordavam com a descrição original da espécie, embora fosse considerado um membro do gênero. Diante disso a caracterização, incluindo quimiotaxonômica e outras características fenotípicas, permitiram a designação da linhagem LMG 2819T (= CECT 7311T) como a linhagem de uma nova espécie denominada: *Beijerinckia doebereineriae*.

Apesar de ser muito comum a ocorrência deste gênero em diversos solos, *Beijerinckia* spp. têm sido encontradas em associação principalmente com cana de açúcar (Döbereiner et al., 1995). Döbereiner (1959) verificou a presença de *Beijerinckia* em 95% das amostras de solos cobertas por canaviais contra somente 60% dos solos sob outras vegetações. A autora atribui a influência favorável da cana-de-açúcar sobre a população de *Beijerinckia* a grande quantidade de resíduos ricos em sacarose que permanecem no solo no cultivo habitual da cana, sendo este composto um dos melhores alimentos para esta bactéria. Além destes resíduos, as folhas da cana poderiam estar excretando sacarose e esta por sua vez seria levada ao solo com as chuvas. Döbereiner (1959) ainda sugere que exista uma relação bastante íntima entre este gênero de bactérias e a cana, considerando em até certo ponto como simbiótica, tendo em vista que a bactéria é alimentada pela cana e esta por sua vez aproveita o nitrogênio fixado pela bactéria. A quantificação da fixação biológica em cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Beijerinckia* foi realizado anos mais tarde por meio da atividade da nitrogenase medida pela metodologia da redução do acetileno¹, onde foi constatado uma contribuição de 50kg N/ha/ano (Döbereiner et al., 1973).

Gênero *Dexia*

O gênero *Dexia* pertence à classe β -proteobacteria e a família Alcaligenaceae e possui apenas uma espécie descrita a *D. gummosa* (Jensen et al., 1960). Esta espécie foi isolada em solos da Índia sendo mais tarde isolada em outras regiões tal como o Brasil (Campêlo & Döbereiner, 1970).

Os trabalhos realizados com *Dexia* são escassos, sendo que pouco se conhece sobre a ecologia desta bactéria. No entanto a falta quase completa de informações sobre esta espécie não deve ser devida a dificuldades na identificação, pois esta bactéria é facilmente identificada, mas

¹Método utilizado para quantificar a atividade da nitrogenase por meio da redução do acetileno (Dilworth, 1966). A redução de acetileno baseia-se na habilidade da enzima nitrogenase em reduzir outros substratos além do N_2 , como o acetileno (C_2H_2) e o etileno (C_2H_4). O acetileno é produzido em um Erlenmeyer através da reação do carbureto de cálcio (CaC_2) com água; então 1 mL deste gás é injetado em cada tubo contendo meio semi-sólido com os isolados crescidos. Após 1 hora é retirado 1 mL do gás presente em cada tubo para verificar a produção de etileno por meio de leitura por cromatografia gasosa. No entanto, esta técnica é atualmente muito criticada para estimativa do N_2 fixado.

sim por falta de métodos adequados para o isolamento (Campêlo & Döbereiner, 1970).

Bactérias do gênero *Derxia*, foram isolados de raízes de *Oriza perenne* cultivados em solos de várzea na região Amazônica (Magalhães, 1981) e ainda em arroz e outras plantas em solos geralmente alagados e ricos em matéria orgânica (Döbereiner et al., 1995). Tem-se que este gênero é condicionado à umidade abundante no solo e que o tipo de cobertura vegetal pouco ou nada influiu na ocorrência deste gênero (Campêlo & Döbereiner, 1970).

Gênero *Azospirillum*

Dentre as bactérias diazotróficas, os do gênero *Azospirillum*, descrito por Tarrand et al. (1978), são constituídos de microrganismos procariotos, denominados por alguns autores Eubacteria (bactérias verdadeiras), mas precisamente situados no Domínio Bacteria na subdivisão α -Proteobacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirilo. São bactérias diazotróficas associativas endofíticas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos. O gênero atualmente possui quatorze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978); *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983); *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987); *A. irakense* (Khammas et al., 1989); *A. largomobile* (Dekhil et al., 1997); *A. doebereinae* (Eckert et al., 2001); *A. oryzae* (Xie & Yokota, 2005); *A. melinis* (Peng et al., 2006); *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a); *A. zea* (Mehnaz et al., 2007b); *A. rugosum* (Young et al., 2008); *A. picis* (Lin et al., 2009) e *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010). A nomenclatura de *A. largomobile* foi corrigida por Sly & Stackebrandt (1999) para *A. largomobile*. Estas bactérias são preferencialmente microaerófilas e são móveis em meio de cultivo, possuindo flagelo polar bem desenvolvido quando são crescidos em meio líquido. Quando são crescidos em meio semi-sólido, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. irakense* e *A. largomobile*, além do flagelo, polar desenvolvem flagelos laterais adicionais (Tarrand et al., 1978; Khammas et al., 1989; Dekhil et al., 1997). *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. doebereinae* e *A. oryzae* apresentam flagelo monopolar (Magalhães et al., 1983; Reinhold et al., 1987; Eckert et al., 2001; Xie & Yokota, 2005). Células de *Azospirillum* podem apresentar pleomorfismo (Olubayi et al., 1998), tanto em meio de cultura (Eckert et al., 2001), quanto no solo na presença de fatores estressantes (Bashan, 1991). Estas se proliferam em condições aeróbicas, mas são preferencialmente microaerófilas na presença ou ausência de N_2 no meio, onde são muito móveis. *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. largomobile* e *A. irakense* apresentam uma combinação típica de flagelos: um flagelo polar desenvolvido quando as bactérias são crescidas em meio líquido e vários flagelos

laterais adicionais, quando cultivadas em meio semi-sólido. *A. halopraeferens*, *A. amazonense* e *A. doebereinae* somente apresentam flagelo polar (Magalhães et al., 1983; Reinhold et al., 1987; Eckert et al., 2001).

Bactérias deste gênero têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Magalhães & Döbereiner, 1984; Lange & Moreira, 2002), apresentando uma distribuição ecológica ampla (Döbereiner & Pedrosa, 1987). Uma consequência dessa versatilidade é a baixa especificidade em relação à planta hospedeira e as diversas vias metabólicas alternativas que permitem o microrganismo utilizar uma variedade de ácidos orgânicos e aromáticos (Victoria & Lovell, 1994), açúcares e aminoácidos disponíveis na rizosfera (Hartmann & Zimeer, 1994). No solo, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas no mucigel presente na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes. Na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares de raízes e lá se alojarem (Bashan & Levanony, 1990; Baldani et al., 1996). A espécie *Azospirillum amazonense* (Magalhães et al., 1983) tem sido isolada de cereais, forrageiras e pupunheira no Brasil (Magalhães, et al., 1983; Magalhães & Döbereiner, 1984; Baldani et al., 1997). A espécie *A. irakense* tem sido isolada de raízes de arroz na região subtropical do Iraque (Khammas et al., 1989). *A. halopraeferens* tem sido isolado da gramínea Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.) que cresce em solos salino-sódicos no Paquistão (Reinhold et al., 1987). Já *A. largomobile* tem ocorrência restrita em áreas de um lago na Austrália (Dekhil et al., 1997). *A. doebereinae* foi isolada de raízes da gramínea do gênero *Miscanthus*, cultivada na Alemanha (Eckert et al., 2001). *A. oryzae* isolada de arroz (*Oryza sativa*) no Japão, possui células em forma de espirilo ou vibrio, móveis (Xie & Yokota, 2005). *A. melinis* foi isolada de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) na China, promovendo o crescimento da planta e aumentando sua tolerância a acidez do solo (Peng et al., 2006). Já *A. canadense* e *A. zea* foram ambas isoladas da rizosfera de milho no Canadá (Mehnaz et al., 2007a; Mehnaz et al., 2007b). Outras duas espécies não foram isoladas da rizosfera ou de tecidos vegetais, mas de solo contaminado com óleo *A. rugosum* (Young et al., 2008) e manancial de sulfeto na Rússia *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010), mas ambos são fixadores de nitrogênio.

Tem sido verificado que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção. Tais mecanismos permitem classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes (Bashan & Levanony, 1990; Del Gallo & Fendrik, 1994), dentre eles: produção de melanina, poli- β -hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos

(Del Gallo & Fendrik, 1994), formação de cistos (agregados celulares) e mudança na forma da célula. Segundo trabalho realizado por Bashan (1991), em plantas de sorgo que não foram submetidas ao estresse hídrico, *Azospirillum* ocorria na forma víbrio, enquanto nas plantas que foram submetidas ao estresse, eles ocorriam na forma cística, preferencialmente. Quando as condições de estresse foram removidas, as células bacterianas reverteram-se para formas víbrio com um concomitante crescimento da população. Aparentemente, a forma cística é a resposta da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera.

Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* é composto atualmente de dez espécies: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986); *H. rubrisulbalbicans* (Baldani et al., 1996); *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001); *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003); *H. chlorophenolicum* (Im et al., 2004); *H. huttiense* subsp. *huttiense*, (Ding & Yokota, 2004); *H. hiltneri* (Rothballer et al., 2006); *H. rhizosphaerae* (Jung et al., 2007), *H. huttiense* subsp. *putei*, *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* (Dobritsa et al., 2010). As espécies estão incluídas como um grupo na subdivisão β -Proteobacteria e são Gram-negativas. Dependendo da estirpe e da variedade de arroz, algumas espécies de *Herbaspirillum* podem fixar de 19 a 54% do nitrogênio requerido por esta cultura (Kennedy et al., 2004). A espécie *H. chlorophenolicum* não fixa nitrogênio e não está associada a plantas (Im et al., 2004).

Inicialmente *H. seropedicae* foi considerada uma nova espécie de *Azospirillum* por ter apresentado características de crescimento em meio de cultura semi-sólido (sem N) similares a esse gênero. Entretanto, após análise do 16s rRNA foi evidenciado que se tratava de um novo gênero de bactéria diazotrófica (Baldani et al., 1986). Posteriormente, Baldani et al. (1996) reclassificaram *Pseudomonas rubrisulbalbicans*, primeiramente descrita como agente causadora da estria mosqueada em variedades sensíveis de cana-de-açúcar, em *H. rubrisulbalbicans*. As três espécies foram incluídas como um grupo na subdivisão β -Proteobacteria, junto com *Orolobacter formigenes* como demonstrado por Sievers et al. (1998). As células deste gênero são gram-negativas contendo grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), formato espirillum, móveis e com presença de 1-3 flagelos unipolares na espécie *H. frisingense*, de 1-3 flagelos bipolares na espécie *H. seropedicae* e vários flagelos bipolares na espécie *H. rubrisulbalbicans*.

O gênero *Herbaspirillum* tem sua ocorrência um pouco mais restrita do que as demais espécies de diazotróficos atualmente conhecidas. *H. seropedicae* isolada primeiramente por Baldani et al. (1986), em associação com raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*)

e sorgo (*Sorghum bicolor*), apresenta baixa sobrevivência em solo sem cultivo (Baldani et al., 1992). Essa espécie tem sido isolada de vários membros da família Gramineae sendo encontrada colonizando raízes, caule e parte aérea de arroz e milho (Olivares et al., 1996). A espécie *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001) é encontrada nas plantas C4: *Spartina pectinata*; *Miscanthus sinensis*; *Miscanthus sacchariflorus* e *Pennisetum purpureum*. Demais representantes do gênero *Herbaspirillum* também têm sido isolados de bananeiras e abacaxizeiros no Brasil (Weber et al., 2000) e alguns dos isolados obtidos apresentaram características diferenciais das espécies conhecidas (Cruz et al., 2001).

Os representantes do gênero *Herbaspirillum* são considerados bactérias endofíticas obrigatórias e apresentam baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1996), no entanto uma nova espécie *H. rhizosphaerae* foi isolada na rizosfera de *Allium victorialis* var. *platyphyllum* (Jung et al., 2007). *Herbaspirillum* spp. são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo transferir mais eficientemente para planta os compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (Olivares et al., 1997). Por isto, encontram-se livres da competição com outros microrganismos edáficos.

Gênero *Burkholderia*

Bactérias do gênero *Burkholderia* foram descritas, pela primeira vez, por Burkholder (1950) como um patógeno vegetal associado ao apodrecimento dos bulbos de cebola. No entanto, o gênero só foi criado em 1992, por Yabuuchi et al., com base em características fenotípicas, composição de ácidos graxos, homologia DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rDNA, de sete espécies até então consideradas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que foram, então, transferidas para o novo gênero.

O gênero *Burkholderia* pertence à classe β -proteobactéria. São bactérias gram-negativas em forma de bastonetes móveis, com três a vários flagelos. Atualmente, o gênero *Burkholderia* tem 62 espécies descritas (<http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>) com grande diversidade funcional. Esta alta diversidade pode ser resultante da organização e do tamanho do seu genoma. O genoma de diferentes estirpes de *B. cepacia* possui de dois a quatro cromossomos de diferentes tamanhos e contém um grande número de sequências de inserção (Lessie et al., 1996). Este número elevado de sequências de inserção pode ter um papel importante na habilidade desta bactéria de se adaptar a diferentes ambientes por meio de transferência genética e mutação (Tabacchioni et al., 2002).

As espécies contidas neste gênero podem ser patógenos humanos, animais e vegetais (Burkholder, 1950; Isles et al., 1984; Whitlock et al., 2007), promotores do crescimento vegetal (Trân

Van et al., 2000; Peix et al., 2001) e degradadores de poluentes (Nelson et al., 1987; Fries et al., 1997; Radway et al., 1998; Zhang et al., 2000). Diversas espécies do gênero *Burkholderia* também são capazes de fixar nitrogênio atmosférico em simbose, vida livre ou em associações com vegetais como descritas a seguir:

A primeira espécie diazotrófica descrita foi *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995). Esta bactéria foi isolada da rizosfera de plantas de arroz cultivado no Vietnã. Análises de características fenotípicas e genotípicas mostraram que os isolados fixadores de nitrogênio oriundos de plantas de arroz formaram um grupo distinto, juntamente com dois isolados de origem clínica. Estes foram então descritos como *B. vietnamiensis* e todos foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico.

A espécie *B. kururiensis* foi isolada de amostras de um aquífero poluído com tricloroetileno (TCE), no Japão (Zhang et al., 2000) e a capacidade de fixar nitrogênio foi descrita posteriormente (Estrada-de-los-Santos et al., 2001).

B. tropica foi isolada da rizosfera e também de tecidos de plantas de cana-de-açúcar, milho e teosinte, no Brasil, no México e na África do Sul (Reis et al., 2004). *B. unamae* foi isolada da rizosfera, rizoplano e tecidos de plantas de milho, cana-de-açúcar e café cultivadas no México (Caballero-Mellado et al., 2004). *B. xenovorans* possui alta capacidade de degradar compostos de bifenilpoliclorados (PCB) (Goris et al., 2004), mas também é conhecida como diazotrófica (Estrada-de-los-Santos et al., 2001; Caballero-Mellado et al., 2007). Novas estirpes isoladas da rizosfera, raízes e folhas de milho de cana-de-açúcar cultivado no Brasil, capazes de fixar nitrogênio atmosférico, foram identificadas como *B. silvatlantica* (Perin et al., 2006). *B. terrae* e *B. ginsengisoli* também são espécies fixadoras de nitrogênio, tendo sido isoladas de solo de floresta e campo de ginseng, respectivamente, na Coreia do Sul (Yang et al., 2006; Kim et al., 2006). Já *B. heleaia* foi isolada da planta aquática (*Eleocharis dulcis*) (Aizawa et al., 2010).

Minerdi et al. (2001) demonstraram a existência de espécies de *Burkholderia* ocorrendo em endossimbiose com o fungo micorrízico *Gigaspora margarita*, possuindo genes *nif* que se expressavam durante a germinação do esporo. Estes autores relatam que em sistemas naturais, fungos micorrízicos capazes de fixar nitrogênio através da associação com bactérias diazotróficas poderiam se tornar ótimos biofertilizantes.

Bactérias diazotróficas microaerófilas, como as do gênero *Burkholderia*, têm sido isoladas de tecidos de gramíneas (Baldani, 1996), mandioca (Balota et al., 1999), fruteiras (Weber et al., 2000; Weber et al., 2001), milho (Di Cello et al., 1997), café (Santos, et al., 2001), cana-de-açúcar e arroz (Baldani et al., 1995), em ecossistemas amazônicos (Moreira et al., 2002). Segundo Baldani et al. (1995) quando foram inoculadas numa mistura com *H. seropedicae* em plantas

de arroz foram responsáveis por 19 a 35% do N acumulado na planta via FBN.

Também foram encontrados isolados de *Burkholderia* capazes de nodular leguminosas (Achouak et al., 1999; Moulin et al., 2001; Moreira et al., 2002; Vandamme et al., 2002; Vermis et al., 2004; Rasolomampianina et al., 2005; Chen et al., 2006, 2007, 2008).

O gênero *Burkholderia*, também tem sido estudado quanto a sua capacidade de degradação de poluentes, devido a sua grande diversidade de utilização de fontes de carbono. Além da espécie *B. kururiensis*, que utiliza como única fonte de carbono o fenol (Zhang et al., 2000), a espécie *B. cepacia* G4 tem recebido especial atenção pela sua capacidade de degradar compostos como hidrocarbonetos aromáticos e solventes clorados (Radway et al., 1998). O TCE é degradado por *B. cepacia* G4 cometabolicamente utilizando tolueno ou outro composto aromático como única fonte de carbono (Nelson et al., 1987). Fries et al. (1997) verificou que a degradação de TCE por uma população nativa de um aquífero contaminado com TCE foi de moderadamente eficiente a não eficiente, e que o sucesso dessa degradação foi limitado pela presença de tolueno e fenol como fontes de carbono. A oxidação do tolueno é realizada pela enzima tolueno monooxigenase (TomA), que também é a enzima responsável pela degradação do TCE (Mars et al., 1996). O gene que codifica para a formação do tolueno monooxigenase está localizado no plasmídeo e é conhecido como pTOM. Assim, essas bactérias possuem um potencial para futuros trabalhos com biorremediação de áreas contaminadas, o que tem despertado o interesse dos pesquisadores.

A grande limitação da utilização de espécies deste gênero é devido a existência de espécies intimamente relacionadas formando o chamado complexo *Burkholderia cepacia*, nas quais são comumente associadas a fibrose cística, uma condição genética que predispõe os portadores a infecções crônicas repetidas do trato respiratório. No entanto, das espécies de *Burkholderia* capazes de fixar nitrogênio somente a *B. vietnamiensis* constitui um membro do complexo *cepacia*. Apesar das espécies de *Burkholderia* diazotróficas (eg. *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica* e *B. silvatlantica*) estarem estreitamente relacionadas, as mesmas apresentam-se filogeneticamente distintas das espécies que constituem o complexo *cepacia* (Caballero-Mellado et al., 2007).

Gênero *Gluconacetobacter*

O gênero *Gluconacetobacter* (Yamada et al., 1998) pertence a classe das α -proteobactérias. Possui características endofíticas e compreende hoje 16 espécies descritas sendo 4 destas capazes de fixar nitrogênio. A *G. diazotrophicus* é uma bactéria fixadora de nitrogênio pertencente ao grupo das

bactérias do ácido acético, foi isolada da cana de açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988). *G. diazotrophicus* ainda foi isoladas em culturas de abacaxi (Tapia-Hernandez et al., 2000) e banana (Muthukumarasamy et al., 2002). Estudos indicam que em algumas variedades de cana a contribuição da FBN pode ser de até 60% (Urquiaga et al., 1992). Atribui-se esta capacidade de fixação a espécie *G. diazotrophicus*. No entanto como outras espécies fixadoras também estão presentes, esta afirmativa deve ser considerada com ressalvas. *Gluconoacetobacter* sp. também tem sido encontrada em arroz silvestre na Índia, que além da capacidade de fixar nitrogênio, solubilizou fosfatos inorgânicos (Loganathan & Nair, 2003). Além de *G. diazotrophicus*, outras duas espécies foram identificadas como fixadoras *G. johannae* e *G. azotocaptans* isoladas de plantas de café (*Coffea arabica* L.) (Fuentes-Ramírez et al., 2001). A mais recente descoberta de uma nova espécie capaz de fixar nitrogênio para este gênero foi a *G. kombuchae* (Dutta & Gachhiu, 2007) isoladas do Kombuchá, um chá fermentado que contém a associação de bactérias com leveduras.

Gênero *Azoarcus*

Pertencente a classe das β -proteobactéria e a família Rhodocyclaceae o gênero *Azoarcus* (Reinhold-Hurek et al., 1993) compreende 7 espécies: *Azoarcus communis* e *Azoarcus indigens* (Reinhold-Hurek et al., 1993), *Azoarcus evansii* (Anders et al., 1995), *Azoarcus tolulyticus* (Zhou et al., 1995), *Azoarcus anaerobius* (Springer et al., 1998), *Azoarcus toluclasticus* e *Azoarcus toluvorans* (Song et al., 1999). Destas, duas são capazes de fixar nitrogênio: *A. indigens* e *A. communis*. São consideradas endofíticas obrigatórias, uma vez que sua ocorrência é praticamente restrita aos tecidos vegetais. Estas duas espécies foram isoladas da raiz da gramínea Kallar (*Leptochloa fusca* (L.) Kunch.) uma espécie amplamente distribuída nos trópicos além de ser tolerante a salinidade e condições de alagamento (Reinhold-Hurek et al. 1993).

A aplicação da análise filogenética de DNA em amostras ambientais demonstrou novos habitats para *Azoarcus*: nos intestinos dos cupins e em arroz cultivados no Japão (Hurek et al., 1997). Este foi o primeiro relato de ocorrência de *Azoarcus* spp. em outra espécie sem ser em *Leptochloa fusca*. A relevância apontada pelos autores sobre este achado reside no interesse potencial do uso de bactérias diazotróficas como *Azoarcus* para o desenvolvimento sustentável da agricultura.

Gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*

Pertencentes a classe Bacilli os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* podem ser facilmente isoladas do solo e da rizosfera de várias plantas (Seldin et al., 1998). Porém a significância ecológica da diversidade genética e fenotípica

de espécies reconhecidas de *Bacillus* e gêneros relacionadas ainda permanece um grande mistério (Gardener, 2004) e muito pouco tem sido feito para indicar quais são as espécies mais comumente isoladas.

Espécies de *Paenibacillus* têm sido isolados de uma grande variedade de fontes incluindo, solo, água, rizosfera de plantas, raízes de árvores, materiais vegetais, alimentos, forragem, fezes e larvas de insetos (Daane et al., 2002).

Várias espécies descritas como bacilos fixadores de nitrogênio pertencem ao gênero *Paenibacillus*, tais como, *P. polymyxa* (Grau & Wilson, 1962), *P. peroiae* (Montefusco et al., 1993), *P. durus* (Collins et al., 1994), *P. borealis* (Elo et al., 2001) *P. graminis* e *P. odorifer* (Berge et al., 2002) *P. brasiliensis* (von der Weid et al., 2002), *P. massiliensis* (Roux & Raoult, 2004), *P. wynnii* (Rodríguez-Díaz et al., 2005), *P. sabiniae* (Ma et al., 2007a), *P. zanthoxyli* (Ma et al., 2007b), *P. donghaensis* (Choi et al., 2008) e *P. forsythiae* (Ma & Chen, 2008).

Em relação às bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, Xie et al. (1998) detectaram atividade da enzima nitrogenase nas espécies *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. firmus* e *B. subtilis*. Além destes *B. marisflavi* (Ding et al., 2005), e *B. alkalidiazotrophicus* (Sorokin et al., 2008).

Além da FBN muitas espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* podem contribuir para a saúde das plantas de várias maneiras, sendo que inúmeros isolados destes gêneros tem sido utilizados como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Siddiqui & Mahmood, 1999; Lacey et al., 2001).

Outros gêneros de diazotróficos associativos

Diversos gêneros pertencentes à Enterobacteriaceae isolados do solo são diazotróficos. Uma idéia especulativa considera que o longo uso de resíduos de animais na agricultura tenha desenvolvido uma flora bem adaptada para animal-solo-ciclo nutricional na rizosfera de plantas (Kennedy et al., 2004). Alguns exemplos de diazotróficos entéricos com atividade de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea* e *Serratia*. O gênero *Klebsiella* descrito por Trevisan (1885), pertence à classe gammaproteobactéria. São bactérias gram-negativas não-móveis, capsuladas, da família Enterobacteriaceae. Até o presente momento estão descritas 12 espécies. De maneira geral este gênero possui dois habitats comuns: no ambiente, como na superfície de águas, solo e plantas, e em superfície mucosa de mamíferos como humanos, cavalos ou suínos (Podschun & Ullmann, 1998). A maioria das espécies do gênero *Klebsiella* são de grande interesse na área médica, hoje no Brasil a atenção está voltada para a superbactéria conhecida como KPC siglas de *Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase a qual já causou segundo dados da vigilância sanitária (Anvisa) 24 mortes em São Paulo, 18 no Distrito Federal e uma em Recife desde o final de 2009 (<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2010/10/casos-da-superbacteria-desde-2009.html>).

Das 12 espécies pertencentes a este gênero podemos destacar as *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* e *K. planticola*, *K. terrigena* como capazes de fixar nitrogênio (Barraquio et al., 1983). Foi em *K. pneumoniae* que o genes *nif* foram descritos pela primeira vez (Dixon et al., 1980). Os genes *nif* são requeridos para a estrutura, biossíntese e regulação da nitrogenase e, portanto encontrados em todos os diazotróficos. Além da fixação biológica do nitrogênio, também foi verificado que espécies de *Klebsiella* também sintetizam fitormônios como o ácido indol acético (AIA), promovendo um maior desenvolvimento radicular na cultura do arroz (El-Khawas & Adachi, 1999). As espécies *K. planticola* (Bagley et al., 1981) e *K. terrigena* (Izard et al., 1981) sendo atualmente classificadas como pertencente ao gênero *Raoultella*, sendo *R. planticola* e *R. terrigena* (Drancourt et al., 2001).

Os gêneros *Enterobacter* e *Pantoea* têm sido isolados de uma ampla variedade de culturas, tanto epífitos como endofíticos (Asis & Adachi, 2003). Fernandes et al. (2001), utilizando os meios semi-sólidos JNFb e NFB para quantificar, isolar e identificar bactérias diazotróficas existentes nas raízes e folhas de coqueiro, verificaram que dos 20 isolados obtidos, 13 foram pertencentes ao gênero *Enterobacter*, sendo que nove foram *E. cloacae*. Todos os isolados obtidos neste experimento foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Kämpfer et al. (2005) propuseram uma nova espécie do gênero *Enterobacter*, *E. radicincitans*, capaz de produzir fitormônios e fixar nitrogênio atmosférico. *Enterobacter oryzae* uma espécie diazotrófica isolada da superfície de raízes de arroz selvagem *Oryza latifolia* (Peng et al., 2009). Asis & Adachi (2003) isolaram do caule de batata doce, no Japão, o endofítico não diazotrófico *Enterobacter asburiae* e o diazotrófico *Pantoea agglomerans*. O isolamento de *Pantoea agglomerans* apresentou atividade da nitrogenase e pode estar contribuindo para a fixação biológica de nitrogênio na cultura de batata doce japonesa, mas a magnitude da contribuição de *E. asburiae* necessita de estudos futuros.

Outra espécie pertencente à família *Enterobacteriaceae* é a *Serratia marcescens*. Experimentos de inoculação com *Serratia marcescens* em solo não estéril, em casa de vegetação, mostrou que esta bactéria pode ser facilmente introduzida junto a plantas de arroz através da sua inoculação em sementes ou raízes antes do plantio, demonstrando redução do acetileno após a colonização (Gyaneshwar et al., 2001). Além disso, o gênero *Serratia* apresenta

espécies que produzem biosurfactantes que podem ser utilizados para biorremediação de águas e solos isto porque, os biosurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo que acelera a degradação de vários óleos por microrganismos (Urum & Pekdemir, 2004). Esta espécie também é um patógeno oportunista para humanos, causando muitas infecções nosocomiais (Grimont & Grimont, 1978, citado por Matsuyama et al., 1995). Tripathi et al. (2002), através da caracterização molecular da comunidade bacteriana tolerante à salinidade na rizosfera de arroz, utilizando ARDRA, RAPD e sequenciamento do rDNA 16S, encontraram quatro grupos representativos, sendo que um deles, no sequenciamento, apresentou 97% de similaridade com *Serratia marcescens*. Esta espécie também tem sido encontrada em algodão e milho doce (McInroy & Kloepper, 1995).

Métodos de detecção dos diazotróficos associativos

As bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas em espécies de Leguminosae (BFNNL) ocorrem em populações praticamente puras no interior de nódulos intactos e por isso, o primeiro passo para seu isolamento bem sucedido consiste de uma desinfestação superficial dos nódulos para eliminação de outros organismos do solo que estavam aderidos a esta superfície. Em seguida, uma massa do interior dos nódulos onde estão as BFNNL é repicada para um meio de cultura complexo e rico em nitrogênio onde as BFNNL crescerão em culturas puras se a desinfestação superficial foi bem sucedida, se o nódulo estava realmente intacto (ou seja, sem qualquer dano físico que pudesse ter proporcionado a entrada de outros organismos) e se as condições de assepsia geral no procedimento foram rigorosamente seguidas.

Como as bactérias associativas não formam estruturas como os nódulos, onde estariam em populações isoladas de outros organismos, ao contrário, estão dispersas no solo e na ecto e/ou na endorizosfera junto com outros organismos, é necessário o uso de meios seletivos que permitam o isolamento de diazotróficos a partir de comunidades com alta diversidade de espécies como as que ocorrem no ambiente edáfico. A principal característica seletiva destes meios é a ausência de N na forma combinada (cátions, ânions, aminoácidos, proteínas, etc.) uma vez que só os diazotróficos conseguem utilizar o N₂ do ar. No entanto, à medida que os fixadores crescem, pode ocorrer aumento do teor de nitrogênio na forma combinada devido à excreção de N fixado no meio. Deve se considerar também que a própria fonte de inóculo, seja solo ou pedaços de raízes, tem pequenas quantidades de N combinado. Isto permitirá o crescimento de espécies não fixadoras de N₂. Por isso, é importante que o isolamento

seja feito logo no início do crescimento, onde em princípio o crescimento dos diazotróficos é favorecido. A disponibilidade de O₂ no meio é outra característica importante, uma vez que os diazotróficos associativos aeróbios têm diferentes estratégias para proteger a nitrogenase do O₂ que pode danificá-la irreversivelmente. Há espécies que protegem o sítio com quantidades significativas de exopolissacarídeos ou pelo aumento da taxa de respiração como as dos gêneros *Azotobacter*, *Derxia* e *Beijerinckia* e por isso podem ser isoladas em meios de cultura sólidos (em placas) ou líquidos (eg. LG-Lipman, 1904; meio de Becking (1961)). Outras são microaerofílicas e só crescem em concentrações reduzidas de O₂. Neste último caso, meios de consistência semi-sólida (como uma gelatina) propiciam um gradiente de difusão de O₂ adequado para que as populações se situem em sítios onde a concentração é suficiente para respiração de uma determinada densidade de organismos, sem excessos que possam danificar a enzima. A medida que as bactérias se multiplicam e a densidade aumenta, o maior consumo de O₂ leva a película a se mover em direção a superfície onde concentrações maiores de O₂ estão disponíveis. Outras características do meio dizem respeito às condições físico químicas ótimas para o crescimento de espécie (s) alvo (s) como pH, fonte de carbono, temperatura, etc. Estas podem ser ajustadas no meio, após testes verificando as condições ótimas de crescimento para determinada espécie alvo, de modo a favorecer seu crescimento em detrimento de espécies contaminantes, ou seja, indesejáveis. Os meios mais usados para detecção de diazotróficos são os de consistência semi-sólida,

por seu custo reduzido, facilidade de manuseio e fácil constatação do crescimento pela película característica próxima a superfície do meio. Meios semi-sólidos que favorecem o crescimento de determinadas espécies são NFB (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*) (Okon et al., 1977), NFB mod. e Fam (*Azospirillum amazonense*) (Magalhães et al., 1979; Magalhães et al., 1983; Magalhães & Döbereiner, 1984), LGI (*Azospirillum amazonense*) (Magalhães et al., 1983), JNFB (Döbereiner et al., 1995). No entanto, deve se levar em consideração que estes meios embora favoreçam determinadas espécies permitem o crescimento de outras espécies fixadoras (Magalhães & Döbereiner, 1984; Nóbrega et al., 2004).

Efeito das alterações no ecossistema sobre os diazotróficos associativos

Bactérias diazotróficas tem sido detectadas em rizosfera de plantas em densidades de até 10⁷/g (Magalhães et al., 1979). Modificações significativas nas propriedades físico químicas do solo causadas pelos os diversos usos seja por adição ou remoção de elementos e/ou práticas de cultivo poderão causar alterações na comunidade microbiana (Moreira & Siqueira, 2006). Diante disto diversos fatores afetam os organismos do solo, tornando suas populações extremamente variáveis, sendo dependentes do tipo de solo, da vegetação e das condições climáticas, podendo ser encontradas grandes variações entre ecossistemas distintos na mesma região ou mesmo de distintas regiões geográficas. A Tabela 2 resume dados de alguns trabalhos realizados nos últimos anos que demonstram como a variação da vegetação influencia na

Tabela 2. Densidade de bactérias diazotróficas em amostras de solo e raiz de diversas espécies presentes em ecossistemas brasileiros.

Espécie/Ecossistema	Raízes (log do NMP) bactérias g ⁻¹ raiz fresca				Solo (log do NMP) bactérias g ⁻¹ solo seco			
	NFB	JNFB	LGI	FAM	NFB	JNFB	LGI	FAM
<i>Araucária angustifolia</i> /Floresta Nativa de araucária (Neroni & Cardoso, 2007)	1,68	2,29	2,32	-	2,44	2,40	2,81	-
<i>Araucária angustifolia</i> /Replante de araucária com ocorrência de incêndio (Neroni & Cardoso, 2007)	3,6	3,55	3,92	-	2,03	2,33	2,47	-
<i>Araucária angustifolia</i> /Replante de araucária com ocorrência de incêndio (Neroni & Cardoso, 2007)	2,0	1,74	1,95	-	2,53	2,70	2,37	-
<i>B. decubens</i> , <i>B. mutica</i> e <i>Andropogon</i> sp./ Áreas contaminadas por metais pesados (Moreira et al., 2008).	3,5 - 5,63	2,27 - 5,5	-	2,81 - 3,68	1,30 - 4,34	0 - 2,72	-	0,57 - 2,34
Coqueiro (<i>Cocos nucifera</i>) Fernandes et al., 2001	3,0	4,43	-	-	-	-	-	-
Braquiária e Feijão-guandu/ Áreas de reabilitação após mineração de Bauxita (Melloni et al., 2004)	2,14 - 2,75	0 - 2,04	-	1,72 - 2,23	-	-	-	-
Eucalipto/Áreas de reabilitação após mineração de Bauxita (Melloni et al., 2004)	0 - 1,95	0	-	0 - 2,0	-	-	-	-
Capim azevém e <i>Eupatorium</i> sp./ Áreas de reabilitação após mineração de Bauxita (Melloni et al., 2004)	2,41 - 2,50	2,04 - 2,86	-	2,5 - 3,28	-	-	-	-
Braquiária e capim gordura/ Áreas de reabilitação após mineração de Bauxita (Melloni et al., 2004)	2,25 - 2,59	2,36 - 2,59	-	0 - 2,85	-	-	-	-
<i>Brachiaria humidicola</i> / Pastagem (Brasil et al., 2005)	2,8 - 6,0	3,8 - 5,9	4,3 - 6,10	-	3,0 - 6,3	3,4 - 5,2	4,0 - 5,8	-
<i>Axonopus purpusii</i> / Pastagem/ (Brasil et al., 2005)	3,3 - 5,9	3,1 - 6,1	3,3 - 6,2	-	3,5 - 5,5	2,4 - 5,1	4,9 - 6,2	-
<i>Elyonurus muticu</i> / Pastagem/s (Brasil et al., 2005)	3,3 - 5,5	6,2 - 6,84	5,2 - 5,5	-	3,4 - 5,7	1,0 - 2,9	4,4 - 5,8	-

densidade de bactérias diazotróficas.

Melloni et al. (2004) avaliaram a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em áreas em reabilitação após algumas décadas de mineração de bauxita. As áreas foram submetidas a diversos processos de reabilitação com diferentes tipos de vegetação: gramíneas, leguminosas herbáceas, bracatinga, espécies arbóreas nativas e *Eucalyptus saligna*. A densidade da população de diazotróficos associativos foi estimada através do número mais provável, o isolamento foi realizado nos meios JNFb (*Herbaspirillum* spp.), NFb (*Azospirillum* spp.), Fam (*Azospirillum amazonense*) e a caracterização cultural dos isolados, realizada em meio batata. Os autores verificaram que o tipo de vegetação afetou a densidade dos diazotróficos, a qual foi baixa em todas as áreas em reabilitação se comparada aos sistemas agrícolas; porém, houve grande diversidade fenotípica cultural entre os isolados obtidos. Nóbrega et al. (2004) avaliaram a diversidade fenotípica cultural em meio GNA, a morfologia celular, a tolerância ao cloreto de sódio e a análise de proteínas totais pela técnica de SDS-PAGE de 72 isolados obtidos em áreas em reabilitação de mineração de bauxita, isolados nos meios NFb, JNFb e Fam. Os autores encontraram uma grande diversidade fenotípica entre os microrganismos obtidos, com alta dissimilaridade em relação às espécies descritas, sugerindo novas espécies. Houve uma correlação entre os grupos formados pelo perfil protéico total e a caracterização morfológica celular. Os meios de cultivo Fam e JNFb, considerados específicos para *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp., também permitiram o isolamento de outras espécies. Em ambos os trabalhos, a alta diversidade fenotípica, segundo os autores, pode estar relacionada à resiliência das espécies no solo retirado para a mineração, e que foi utilizado para a reabilitação das áreas, ou à entrada destas espécies através das sementes da vegetação utilizada no processo de recuperação.

Em estudo realizado utilizando os meios NFb, Fam e LGI para quantificar e isolar diazotróficos de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, verificou-se que a densidade em meio NFb foi maior nos sistemas de uso da terra agricultura e agrofloresta. Nos meios LGI e Fam a densidade foi maior em pastagem (Silva, 2006). Foram obtidos isolados de diferentes grupos filogenéticos pertencentes aos gêneros *Burkholderia* (Betaproteobacteria), *Enterobacter* e *Serratia* (Gammaproteobacteria), e *Bacillus* (Firmicutes) (Silva, 2006). Os solos de pastagem foi o sistema de uso que capturou o maior número de isolados, com predominância de *Burkholderia* e *Bacillus*. Gammaproteobacteria foi isolada de todos os sistemas de uso, exceto de pastagem. Outro estudo na mesma região (Jesus et al., 2009) avaliando a estrutura e composição da comunidade bacteriana através da clonagem

e seqüenciamento usando a técnica T-RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição terminais) verificaram alterações na comunidade bacteriana relacionada ao sistema de uso do solo, provavelmente através dos atributos do solo, encontrando seqüências de Betaproteobacteria (*Burkholderia*) e Gammaproteobacteria principalmente em floresta primária.

Em sítios contaminados por metal pesado Moreira et al. (2008) avaliaram a densidade de populações de bactérias diazotróficas associativas e caracterizaram os isolados destas populações através da análise fenotípica (tolerância aos metais pesados zinco e cádmio e à NaCl *in vitro*, perfis protéicos), e genotípica (seqüenciamento de 16S rDNA), comparados às estirpes tipo das mesmas espécies. As densidades foram avaliadas nos meios, Fam, NFb e LGI. Tanto as amostras de solo quanto as de raiz de sítios contaminados foram semelhantes àquelas relatadas na literatura para solos agrícolas. Isolados de *Azospirillum* spp. de solos contaminados e estirpes tipo oriundas de solos não contaminados variaram substancialmente com relação à tolerância a Zn⁺² e Cd⁺², sendo que Cd⁺² mais tóxico que Zn⁺². A maioria dos isolados mais tolerantes a metais pesados também foi tolerante ao estresse salino, o que foi indicado por seu crescimento em meio sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de NaCl *in vitro*. Cinco isolados apresentaram alta dissimilaridade em perfis protéicos e o seqüenciamento do gene 16S rDNA em dois deles revelou que apresentam novas seqüências de *Azospirillum*.

Os dados destas pesquisas realizadas evidenciam as alterações na comunidade microbiana em relação ao manejo aplicado. No entanto é notável como os diazotróficos associativos resistem a estas mudanças mesmo quando estas são extremamente estressantes como em concentrações elevadas de metais pesados.

Processos de promoção do crescimento vegetal por diazotróficos associativos: potencial de aplicações

Além da capacidade de fixar nitrogênio, é de interesse que essas bactérias possuam outras características importantes para o desenvolvimento vegetal, como solubilizar fosfatos inorgânicos, sintetizar compostos que promovam o crescimento radicular ou que apresentem efeito antagônico contra fitopatógenos. Isso porque, além da fixação biológica de nitrogênio, as diazotróficas podem contribuir para o crescimento vegetal de outras culturas não leguminosas e até para leguminosas por meio desses processos. As bactérias que contribuem para o crescimento vegetal são conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) - "plant growth-promoting rhizobacteria" (PGPB) (Kloepper & Schroth, 1978).

Azospirillum são classificados como bactérias promotoras de crescimento das

plantas (Okon, 1985), pois, muitas evidências têm apontado para o efeito da colonização bacteriana beneficiando a planta, com produção de fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) que estimulam seu crescimento (Reynders & Vlassak, 1979; Tien et al., 1979; Zimmer et al., 1988; Bottini et al., 1989). Um resumo dos efeitos benéficos dos *Azospirillum* para as plantas pode ser caracterizado como: estímulo ao aumento da densidade e comprimento dos pêlos absorventes das raízes; incrementos na velocidade de aparecimento de raízes laterais e do volume de superfície radicular; alteração da respiração das raízes e das atividades de enzimas da via glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos; produção de nitratos; aumento na absorção de nutrientes e sinais moleculares que interferem no metabolismo das plantas (Okon & Labandera-Gonzales, 1994; Basha & Holguin, 1997). Além dos efeitos hormonais, os *Azospirillum* ainda contribuem para a planta associada com nitrogênio fixado (Boddey et al., 1983; Riggs et al., 2001), possibilitando o aumento da disponibilidade desse íon no sistema radicular (Christiansen-Weniger & Vanderleyden, 1994). Dessa forma, segundo Basha (1998), a inoculação em diversas espécies vegetais com esse microrganismo pode ser recomendada, pois, além do incremento de produção, tal organismo não causa doença nas plantas. Efeitos positivos da co-inoculação de *Azospirillum* e *Rhizobium* também têm sido relatados (Andreeva et al., 1993; Itzigsohn et al., 1993). O incremento de produção devido à dupla inoculação das plantas pode ser atribuído à nodulação precoce, aumento do número de nódulos e estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais (Volpin & Kapunik, 1994), ocasionados possivelmente pela produção de fitormônios pelo microrganismo os quais promovem a diferenciação das células da epiderme dos pêlos radiculares, proporcionando aumento no número de potenciais sítios de infecção rizobial (Yahalom et al., 1990). Segundo Okon & Labandera-Gonzales (1994), resultados acumulados de 20 anos de pesquisa em todo mundo, utilizando inoculações com *Azospirillum* demonstram que cerca de 60 a 70% dos experimentos têm apresentado resultados significativos, indicando elevação na produção das culturas na ordem de 5 a 30%.

Entretanto, a imprevisibilidade dos resultados de inoculação tem limitado o uso comercial destes organismos como inoculantes na agricultura. Os possíveis fatores desta imprevisibilidade podem ser: a competitividade do inoculante com a população nativa de microrganismos, dificuldades na formulação de inoculantes (manutenção da viabilidade, alto número de células e estágio do crescimento), baixa sobrevivência das estirpes inoculadas nos diferentes solos, agentes microbianos adversos, especificidade do inoculante, entre outros (Boddey & Döbereiner, 1988; Basha & Holguin,

1997).

Didonet & Magalhães (1993) avaliaram a inoculação de *Azospirillum* em plântulas de trigo e verificaram a indução do alongamento e ramificação radicular e associaram com a capacidade de algumas estirpes de *Azospirillum* produzirem AIA (ácido indolil 3-acético) e nitrato, substâncias estas capazes de promover o crescimento vegetal. A inoculação de estirpes de *Azospirillum brasiliense*, 245 e JA04 nas formas de inoculantes com turfa em pó e turfa granulada favoreceram o aumento da produção de grãos de trigo em relação à testemunha sem nitrogênio (Didonet et al., 1996).

Espécies de *Herbaspirillum* também podem contribuir para o crescimento vegetal através de outros fatores, além da FBN. Na espécie *H. seropedicae* foi detectada a produção de AIA e giberelinas A₁ e A₃ (Bastián et al., 1998). Radwan et al. (2002) também constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum*, incluindo *H. rubrisubalbicans*. No entanto, a sua contribuição como RPCV é menor do que apresentada por outras bactérias.

Além disso, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* e outras bactérias endofíticas dentre elas: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia* sp. foram isolados de cana de açúcar (Urquiaga et al., 1992; Baldani et al., 1997; Yoneyama et al., 1997; James, 2000). No entanto, não se tem a quantificação exata da contribuição individual da FBN desses microrganismos. Quando foram inoculados *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia* sp. a contribuição foi menor que no tratamento que tinha a mistura das cinco espécies citadas. A contribuição da FBN para as variedades de cana-de-açúcar foi de 30 % do N total acumulado nas plantas micropropagadas inoculadas, sugerindo que a combinação das espécies diazotróficas no inoculante foi a melhor estratégia para melhorar o processo de FBN na cana (Oliveira et al., 2002). Para outras espécies vegetais como sorgo (Giller et al., 1986), milho (Boddey, 1987) e arroz (Baldani et al., 2000), a FBN proporcionou um acréscimo de 20 a 30% na aquisição de N. Tais resultados demonstram a contribuição das bactérias endofíticas em fornecer N para o metabolismo e proporcionar benefícios para o crescimento das plantas (James & Olivares, 1997). Também outros mecanismos como produção de fitormônios por esse gênero (Bastián et al., 1998), a qual não é tão efetiva em relação à espécie *Azospirillum brasiliense* (Radwan et al., 2002), pode ser responsável pela promoção do crescimento das plantas, resultando incrementos de produção das culturas no campo (Baldani et al., 2000).

O fósforo é um elemento essencial para plantas, no entanto, apenas 5% do fosfato total do solo estão disponíveis (Epstein, 1972). O fósforo se encontra no solo na forma orgânica (derivada de plantas e microrganismos) e inorgânica

(adicionado via fertilizantes). A adubação com fósforo é uma prática comum em solos agrícolas, mas, a grande maioria do fósforo aplicado acaba se tornando indisponível para as plantas, pois é rapidamente imobilizado por íons de ferro e alumínio em solos ácidos e por íons de cálcio em solos alcalinos. Muitos microrganismos têm a capacidade de solubilizar fosfatos precipitados com ferro, alumínio e cálcio. Essa solubilização tem sido atribuída à liberação de diversos ácidos orgânicos. O ácido glucônico foi o principal responsável pela solubilização de trifosfato de cálcio em uma estirpe de *B. cepacia* (Lin et al., 2006), mas outros ácidos também foram detectados.

São poucos os experimentos realizados com diazotróficos solubilizadores de fosfato, e os resultados obtidos são muitos diversos, variando de acordo com a planta ou a espécie bacteriana. Estudos com *Bacillus firmus* (Datta et al., 1982) comprovaram o aumento na captação do fósforo e na produção em lavouras de arroz, depois da inoculação destas bactérias.

A produção de compostos de baixa massa molecular denominados de sideróforos, que atuam na quelatização de íons de ferro, também é conhecido por inibir o crescimento de alguns fungos fitopatogênicos (Compant et al., 2008), competindo por ferro onde este elemento é limitante. Em estirpes do complexo *B. cepacia* há pelos menos quatro tipos de sideróforos que são produzidos (Meyer et al., 1995; Barelmann et al., 1996).

A produção de fito-hormônios por estirpes de *Burkholderia* também pode atuar no crescimento vegetal. *B. vietnamiensis* promoveu o crescimento de plantas de arroz e esse acréscimo além da fixação biológica de nitrogênio também foi atribuído à produção de fito-hormônios (Trân Van et al., 2000). Estirpes de *Burkholderia* também podem auxiliar no crescimento vegetal mantendo baixos os níveis de etileno na planta por meio da ação da enzima ACC deaminase (Glick et al., 1998). Esta enzima foi detectada, primeiramente, em um isolado de *Burkholderia* obtido de nódulos de *Mimosa pudica* (Pandey et al., 2005) e, posteriormente, foi detectada em *B. xenovorans*, *B. unamae* e *B. phytofirmans* (Sessitsch et al., 2005; Caballero-Mellado et al., 2007). *B. cepacia* e *B. vietnamiensis* isolados da rizosfera de milho e arroz, respectivamente, também produziram ácido indol acético e promoveram o crescimento de plantas de pepino (Bevivino et al., 1994). No entanto, são poucos os estudos quanto à produção de fito-hormônios por estirpes de *Burkholderia*. Estirpes de diazotróficos de *B. tropica*, *B. unamae*, *B. xenovorans* e *B. kururiensis* isoladas da rizosfera de plantas de tomate, no México, apresentaram atividades envolvidas na biorremediação (cresceram utilizando fenol, benzeno ou tolueno), produção de sideróforos e solubilização de fosfatos, o que pode ter grande potencial em aplicações agrobiotecnológicas

(Caballero-Mellado et al., 2007). A estirpe SAOCV2 de *B. cepacia* promoveu o crescimento de plantas de feijão (*P. vulgaris*), o que foi atribuído à solubilização de fósforo, à atividade antifúngica contra *Fusarium* e à promoção da nodulação por rizóbio (Peix et al., 2001). A inoculação da estirpe de *B. vietnamiensis* TVV75 promoveu um acréscimo na produção de grãos de arroz de 13% a 22%, em experimento realizado em condições de campo, no Vietnã (Trân Van et al., 2000).

A produção de fito-hormônios como estimulantes do crescimento vegetal também são promovidas por espécies de *Paenibacillus*, sendo capazes de produzir e excretar citocininas (Timmsk et al., 1999) e auxinas principalmente o AIA (Lebuhn et al., 1997).

Devido ao potencial de contribuição dos diazotróficos associativos no crescimento vegetal e ao sucesso da inoculação de diazotróficos simbióticos em leguminosas, têm se buscado aplicar essa tecnologia de inoculantes e inoculação para não leguminosas. No Brasil, está sendo testado uma mistura de cinco espécies de diazotrófico (*Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicas*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*), um inoculante misto para cana de açúcar e outras gramíneas (Reis & Reis 2009). Nos próximos anos, este inoculante poderá estar disponível aos agricultores.

Atualmente, disponível a produtores de trigo e milho o inoculante de *Azospirillum brasilense* lançado pela Universidade Federal do Paraná e Embrapa Soja. Menciona-se que este inoculante é fruto de pe das raízes e, consequentemente, em maior squisas realizadas, nos últimos 10 anos, que envolvem desde a seleção de várias estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* até o desenvolvimento do produto que tem como finalidade realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio e promover o crescimento das plantas, pela produção de diversos hormônios vegetais que resultam em um maior crescimento absorção de água e nutrientes. A adoção da tecnologia de inoculação com *Azospirillum*, somente para a cultura do milho, pode resultar em uma economia estimada em U\$1 bilhão por safra, considerando uma área cultivada de 13 milhões de ha, com um rendimento médio de 3.200 kg/ha (<http://www.embrapa.gov.br/embrapa/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo>).

Considerações Finais

Bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal, não apenas pela FBN, mas também por outros processos. No entanto, sua interação com plantas não tem a mesma organização das simbioses o que acarreta em menor eficiência da contribuição dos processos que realizam,

incluindo a FBN, e dificuldades no seu manejo, com respostas nem sempre previsíveis da inoculação. Além disso, várias espécies ocorrem numa mesma planta, o que dificulta a identificação de quais estão contribuindo mais efetivamente e em qual magnitude. A existência de especificidade como a que ocorre nas rizóbio com leguminosas ainda não foi comprovada.

A maior parte dos estudos de bactérias diazotróficas associativas está concentrada no gênero *Azospirillum*, provavelmente por influência das pesquisas realizadas por Johanna Döbereiner, no entanto como visto nesta revisão a grande diversidade destas bactérias vem sendo revelada e pouco ainda se conhece do potencial de aplicações de muitas espécies já descritas. Estudos que promovam este conhecimento devem ser estimulados visando não só uma agricultura de baixo custo e de baixo impacto ambiental, como também o potencial biotecnológico que estas bactérias apresentam.

Identificar as condições de manejo que podem contribuir para a maximização dos processos que elas realizam é desafio da pesquisa atual.

Agradecimentos

À Fundação ao Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Processo CAG-BPD/00033-10), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.H., Heulin, T. 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49: 787-794.

Aizawa, T., Ve, N.B., Nakajima, M., Sunairi, M. 2010. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1152-1157.

Anders, H.J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G. 1995. Taxonomic position of aromaticdegradingdenitrifying Pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov. & *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 327-333.

Andreeva, I.N., Red'kina, T.V., Ismailov, S.F. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium* legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Journal Plant and Physiology* 40: 901-906.

Asis, C.A., Adachi, K. 2003. Isolation of diazotrophic *Pantoea agglomerans* and non diazotrophic *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 38: 19-23.

Bagley, S.T., Seidler, R.J., Brenner, D.J. 1981. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Current Microbiology* 6: 105-109.

Baldani, V.L.D. 1986. *Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica*. 238f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility Soils* 30: 485-491.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Sampaio, M.J.A.M., Döbereiner, J. 1984. A fourth azospirillum species from cereal roots. *Anais da Academia Brasileira de Ciência* 56: 365.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 86-93.

Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L., Döbereiner, J. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubusubalbicas*. *Symbiosis* 13: 65-73.

Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L., Goi, S. R., Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 911-922.

Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 1995. Localization of *Herbaspirillum* spp and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: *International Symposium on Microbiol Ecology. Proceedings...* Santos, Brasil. p.133.

- Baldani, J.I., Pot, B., Kirshhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A.G., Döbereiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 802-810
- Balota, E.L., Lopes, E.S., H. M., Döbereiner, J. 1997. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32: 627-639.
- Balota, E.L., Lopes, E.S., Hungria, M., Döbereiner, J. 1999. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1265-1276.
- Bashan, Y. 1991. Air-bone transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 257-269.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 168-174.
- Bashan, Y., Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43: 103-121.
- Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 591-608.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. 1998. Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24: 7-11.
- Barelmann, I., Meyer, I.M., Taraz, K., Budzikiewicz, D. 1996. Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Zeitschrift für Naturforschung* 51: 627-630.
- Barraquio, W.L., Ladha, J.K., Watanabe, I. 1983. Isolation and identification of N_2 -fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 867-873.
- Becking, J.H. 1961. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. Geographical and ecological distribution in soil. *Plant and Soil* 14: 49-81.
- Beijerinck, M.V. 1901. Über oligotrophile Mikroben. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 7: 561-582.
- Berge, O., Guinebretiére, M., Achouak, W., Normand, P., Heulin, T. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 607-616.
- Bevivino, A., Tabacchioni, S., Chiarini, L., Carusi, M.V., Gallo, M.D., Visca, P. 1994. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia capacia*. *Microbiology* 140: 1069-1077.
- Boddey, R.M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Graminae. *CGC Critical Reviews in Plant Science* 6: 209-266.
- Boddey, R.M., Döbereiner, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108: 53-65.
- Boddey, R.M., Victoria, R.L. 1986. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N -labelled organic matter and fertilizer. *Plant and Soil* 90: 265-292.
- Boddey, R.M., Chalk, P.M., Victoria, R.L., Matsui, E., Döbereiner, J. 1983. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 924-929.
- Bottini, R., Richard, P.P., Fulchieri, M., Pearce, D. 1989. Identification of gibberellins A1, A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90: 45-47.
- Brasil, M.S., Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 179-190.
- Burkholder, W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40: 115-118.

- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Estrada-De Los Santos, P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1165-1172.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., Martínez-Aguilar, L. 2007. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5308-5319.
- Campêlo, A.B., Döbereiner, J. 1970. Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns Estados Brasileiros. *Pesquisa agropecuária Brasileira* 5: 327-332.
- Cavalcante, V.A., Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108: 23:31.
- Chen, W.M., de Faria, S.M., Chou, J.H., James, E.K., Elliott, G.N., Sprent, J.I., Bontemps, C., Young, J.P.W., Vandamme, P. 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2174-2179.
- Chen, W.M., de Faria, S.M., James, E.K., Elliott, G.N., Lin, K.Y., Chou, J.H., Sheu, S.Y., Cnockaert, M., Sprent, J.I., Vandamme, P. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov. isolated from roots nodules of woody Brazilian legumes *mimosa bimucronata* and *Mimosa scrabella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 57: 1055-1059.
- Chen, W. M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J. H., Barrios, E., De Faria, S. M., Elliott, G. N., Sheu, S. Y., Sprent, J. I., Vandamme, P. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1847-1851.
- Choi, J.H., Im, W.T., Yoo, J.S., Lee, S.M., Moon, D.S., Kim, H.J., Rhee, S.K., Roh, D.H. 2008. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 189-193.
- Christiansen-Weniger, C., Vanderleyden, J. 1994. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays* L.) nodules. *Biology and Fertility of Soils* 17: 1-8.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 812-826.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C., Barka, E.A. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural Environment. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 607-626.
- Cruz, L.M., Souza, E.M., Weber, O.B., Baldani, J.I., Döbereiner, J., Pedrosa, F.O. 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2375-2379.
- Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J., Haggblom, M.M. 2002. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 131-139.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L., Sorlini, C. 1998. PCR fingerprinting of whole genomes, the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveals a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 107-116.
- Datta, M., Banik, S., Gupta, R.K. 1982. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant and Soil* 69: 365-373.
- de Bary, A. 1884. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 558p.
- DE-Polli, H. 1975. Ocorrência de fixação de ¹⁵N₂ nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*. 95f. (Dissertação Mestrado)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- DE-Polli, H., Matsui, E., Döbereiner, J., Salati, E. 1977. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by ¹⁵N₂ incorporation. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 119-123.

- Del Gallo, M., Fendrik, I. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum plant association*. CGC Critical Reviews in Plant Science. Boca Raton. p. 57-75.
- Dekhill, S.B., Cahill, M., Stackbrandt, E. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 72-77.
- Dex, H.G. 1950. *Beijerinckia*, a new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soils. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C* 53: 140-147
- Di Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S., Dalmastrì, C. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4485-4493.
- Didonet, A.D., Magalhães, A.C.N. 1993. The role of auxin-like compounds in plant Growth promoting rhizobacteria: the wheat-azospirillum association. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5: 179-183.
- Didonet, A.D., Rodrigues, O., Kenner, M.H. 1996. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 31: 645-651.
- Ding, L., Yakota, A. 2004. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2223-2230.
- Ding, Y.Q., Wang, J.P., Liu, Y., Chen, S.F. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizosphere in Beijing region. *Journal Applied Microbiology* 99: 1271-1281.
- Dilworth, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 127: 285-294.
- Dixon, E., Eady, R.R., Espin, G. 1980. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixing (*nif*) gene cluster with gene fusions. *Nature* 286: 128-132.
- Döbereiner, J. 1953. *Azotobacter* em solos ácidos. *Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas*, Rio de Janeiro 11: 1-36
- Döbereiner, J. 1959. A influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *Revista Brasileira de Biologia* 19: 251-258.
- Döbereiner, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1: 357-365.
- Döbereiner, J. 1961. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Dex in the rhizosphere of sugarcane. *Plant and Soil* 15:211-217.
- Döbereiner, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.
- Döbereiner, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum*. *Flügge Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene* 124: 233-230.
- Döbereiner, J., Day, J.M. 1975. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: Newton, W.E.; Nyman, C.J. (ed.) *Nitrogen fixation*. Washington State University, Washington, USA. p.518-538.
- Döbereiner, J., Pedrosa, F.O. 1987. *Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants*. Science Tech, Madison, USA. 155p.
- Döbereiner, J., Day, J.M., Dart, P.J. 1973. Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum* e da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 8: 153-157.
- Döbereiner, J., Ruschel, A.P. 1958. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia* 1: 261-272.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. 1995. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília, EMBRAPA-SPI; Seropédica, EMBRAPA-CNPAB. 60 p.

- Dobritsa, A.P., Reddy, M. C. S., Samadpour, M. 2010. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1418-1426.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 925-932.
- Dutta, D., Gachhui, R. 2007. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 353-357.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 17-26.
- EL-Khawas, H., Adachi, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils* 28: 377-381.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M., Hahtela, K. 2001. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogenfixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 535-545.
- Epstein, E. 1972. *Mineral nutrition of plants, principles and perspectives*. John Wiley & Sons, New York, USA. 412 p.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J. 2001. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2790-2798.
- Fernandes, M.F., Fernandes, R.M., Rodrigues, L.S. 2001. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 1509-1517.
- Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E.T., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1305-1314.
- Fries, M.R., Forney, L.J., Tiedje, J.M. 1997. Phenol and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1523-1530.
- Gardener, B.B.M. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. The nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1252-1258.
- Gillis, M., Van, T.V., Bardin, R., Goor, M., Hebbbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters K., Heulin, T., Fernandez, M.P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 2274-289.
- Giller, K.E., Wani, S.P., Day, J.M. 1986. Use of isotope dilution to measure nitrogen fixation associated with the roots of sorghum and millet genotypes. *Plant and Soil* 90: 255-263.
- Glick, B.B., Penrose, D.M., Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190: 63-68.
- Goris, J., de Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J.; Falsen, E., Quensen lii, J. F., Tiedje, J.M., Vandamme, P. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400^(T) and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1677-1681.
- Grau, F.H., Wilson, P.W. 1962. Physiology of nitrogen fixation by *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology* 83: 490-496.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Natarajan, M., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B., Ladha, J.K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183: 2634-2645.

- Hartmann, A., Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.) *Azospirillum/Plant associations*. CGC Critical Reviews in Plant Science, Boca Raton, USA. p.15-39.
- Hurek, T., Egner, T., Reinhold-Hurek, B. 1997. Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., Proteobacteria of the beta subclass. *Journal of Bacteriology* 179: 4172-4178.
- Im, W.T., Bae, H.S., Yokota, A., Lee, S.T. 2004. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 851-855.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *Journal of Pediatrics* 104: 206-210.
- Itzigsohn, R., Kapulnik, Y., Okon, Y., Dovrat, A. 1993. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium melilot* and alfafa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasiliense*. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 610-615.
- Izard, D., Ferragut, C., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J., Leclerc, H. 1981. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31: 116-127.
- James, E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209.
- James, E.K., Olivares, F.L. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *CGC Critical Reviews in Plant Science* 17: 77-119.
- Jensen H.L. 1995. *Azotobacter macrocytogenes* n. sp., a nitrogen-fixing bacterium resistant to acid reaction. *Acta Agriculturae Scandinavica* 5: 278-293.
- Jensen, H.L., Petersen, E.J., De, P.K., Bhattacharya, R. 1960. A New nitrogen-fixing bacterium: *Dexia gummosa* nov. gen. nov. spec. *Archiv für mikrobiologie* 36: 182-195.
- Jesus, E.C., Marsh T.L., Tiedje J.M., Moreira, F.M.S. 2009. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal* 3: 1004-1011.
- Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L.E., Tapiá-Hernández, A., Mascarúa-Esparza, M.A., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L.: a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. *Applied of Environmental of Microbiology* 63: 3676-3683.
- Jung, S.Y., Lee, M.H., Oh, T.K., Yoon, J.H. 2007. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2284-2288.
- Kämpfer, P., Ruppel, S., Remur, R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 213-221.
- Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A., Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology* 140: 679-693.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J.I., Reis, V.M., Hartmann, A. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen - fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 157-168.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., Kecskés, M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1229-1244.
- Kim, H.B., Park, M.J., Yang, H.C., An, D.S., Jin, H.Z., Yang, D.C. 2006. *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2529-2533.
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J.I., Reis, V.M., Hartman, A. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 157-168.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. *Proceedings...* Angers, France. Vol.2, p. 879-882.

- Korhonen, T.K., Laakso, T., Roenkoe, R., Hahtela, K. 1989. In: Hattori, I., Maruyama, M. (Ed). *Recent advances in microbial ecology*. Japan Scientific Societies Press, Tokio, Japan. p. 192-195.
- Krasil'nikov, N.A. 1949. Guide to the Bacteria and Actinomycetes. Akademiya Nauk SSSR, Moscow, p. 830.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vanderleyden, J. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do you have a future? *Biological Control* 21: 230-248.
- Lange, A., Moreira, F.M.A. 2002. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 26: 535-543.
- Lavrinenko K., Chernousova, E., Gridneva, E., Dubinina, G. Akimov, V., Kuever, J., Lysenko, A., Grabovich, M. 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* DOI: ijs.0.018853-0
- Lebuhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenobacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 325-334.
- Lessie, T.G., Hendrickson, W., Manning, B.D., Devereux, R. 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiology Letters*, 144: 117-128.
- Lin, S.Y., Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A.B., Chen, W.M., Lai, W.A., Shen, F.T., Rekha, P.D., Yassin, A.F. 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 761-765
- Lin, T.F., Huang, H.I., Shen, F.T., Young C.C. 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology* 97: 957-960.
- Lipman, J.G. 1903. Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria. *Report of the New Jersey Agricultural Experiment Station* 24: 217-285.
- Lipman, J.G. 1904. Soil bacteriological studies. *Report of the New Jersey Agricultural Experiment Station* 25: 237-289.
- Loganathan, P., Nair, S. 2003. Crop specific endophytic colonization by a novel, salttolerant, nitrogen fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* spp. from wild rice. *Biotechnology Letters* 25: 497-501.
- Ma, Y.C., Chen, S.F. 2008. *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. S.F. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 319-323.
- Ma, Y., Xia, Z., Liu, X., Chen, S. 2007a. *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 6-11.
- Ma, Y., Zhang, J., Chen, S. 2007b. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 873-877.
- Magalhães, F.M.M. 1981. Nitrogen-fixing bacteria isolated from diverse soils grass roots in Amazônia. In: Vose, P.B. & Ruschel, A.P. (eds.) *Associative N₂-fixation*. CRC, New York, USA. v.2, p.39-48.
- Magalhães, F.M.M., Döbereiner, J. 1984. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia* 15: 246-252.
- Magalhães, F.M.M., Patriquin, D., Döbereiner, J. 1979. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia* 39: 587-596.
- Magalhães, F.M.M., Souto, S.M., Kuykendall J.R., Döbereiner, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 55: 417-430.
- Mars, A.E., Houwing, J., Dolfing, J., Janssen, D.B. 1996. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 886-891.
- Matsuyama, T., Bhasin, A., Harshey, R.M. 1995. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *Journal of Bacteriology* 177: 978-991.

- McClung, C.R., Patriquin, D.G. 1980. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Canadian Journal of Microbiology* 6: 881-886.
- McClung, C.R., Patriquin, D.G., Davis, R.E. 1983. *Campylobacter nitrofigilis* sp.nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartia alterniflora* Loisel. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 605-612.
- McInroy, J.A., Klopper, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-343.
- Melloni, R., Abrahão, R.S., Moreira, F.M.S., Neto, A.E.F. 2000. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. *Revista Árvore* 24: 309-315.
- Melloni, R., Nóbrega, R.S.A., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2004. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28: 85-93.
- Mehnaz, S., Weselowski, B., Lazarovits, G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 620-624.
- Mehnaz, S., Weselowski, B., Lazarovits, G. 2007b. *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2805-2809.
- Meyer, J.M., Tran, V., Stinzi, A., Berge, O., Winkelmann, G. 1995. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formely *pseudomonas cepacia*). *Biometales* 8: 309-307.
- Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R., Boarino, A., Bonfante, P. 2001. Nitrogen fixation genes in a endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 725-732.
- Montefusco, A., Nakamura, L.K., Labeda, D.P. 1993. *Bacillus peoriae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 388-390.
- Moreira, F.M.S., Tiedje, J., Marsh, T.L. 2002. *Burkholderia* spp. Are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from Brazilian Leguminosae forest species. In: Reunión Latino Americana de Rhizobiología, 21 Congreso Nacional de la fijación biológica de nitrógeno. *Memorias... Cocoyoc, México*. p.45-46.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2ª ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p.
- Moreira, F.M.S., Lange, A., Klauberg-Filho, O., Siqueira, J.O., Nóbrega, R.S.A., Lima, A.S. 2008. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80: 749-781.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Bolvin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 21: 948-950.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science* 83: 137-145.
- Neal, J.L., Larson, R.I., 1976. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 151-155.
- Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R., Pritchard, P.H. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 949-954.
- Neroni, R.F., Cardoso, E.J.B.N. 2007. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola* 64: 303-304.
- NCBI. National Center of Biological Information. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> <Acesso em 27 out. 2010>
- Nóbrega R.S.A., Moreira F.M.S., Siqueira J.O., Lima A.S. 2004. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28: 269-279.
- Oggerin, M., Arahál, D.R., Rubio, V., Marín, I. 2009. Identification of *Beijerinckia fluminensis* strains CIP 106281^T and UQM 1685^T as *Rhizobium radiobacter* strains, and proposal of *Beijerinckia doebereineriae* sp. nov. to accommodate *Beijerinckia fluminensis* LMG 2819. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2323-2328.

- Okon, Y. 1985. *Azospirillum*: as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology* 3: 223-228.
- Okon Y, Albrecht SL, Burris RH. 1977. Methods for Growing *Spirillum lipoferum* and for Counting It in Pure Culture and in Association with Plants. *Applied Environmental Microbiology* 33: 85-88.
- Okon, Y., Labandera-Gonzales, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1591-1601.
- Olivares, F.L., Baldani, V.D.L., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominant in Graminae. *Biology and Fertility of Soils* 21: 197-200.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist* 135: 723-737.
- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., Baldani, J.I. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil* 242: 205-215.
- Olubayi, O., Caudales, R., Atkinson, A., Neyra, C.A. 1998. Differences in chemical composition between nonflocculated and flocculated *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal Microbiology* 44: 386-390.
- Page W.J., Shivprasad S. 1991. *Azotobacter salinestrus* sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fixing bacterium. *International Journal Systematic Bacteriology* 41: 369-376.
- Pandey, P., Kang, S.C., Maheshwari, D.K. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science* 89: 177-180.
- Paula, M.A. 1992. *Interação micorrizas vesículo-arbusculares-bactérias diazotróficas em batata-doce (Ipomoea batatas (L.) Lam. 168f. (Tese de Doutorado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Brasil.*
- Paula, M.A., Reis, V.M., Döbereiner, J., 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Sacharum* spp.) and sweet (*Sorghum vulgare*). *Biology and Fertility of Soils* 11: 111-115.
- Peix, A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1927-1935.
- Peng, G., Zhang, Wu., Luo, H., Xie, H., Lai, W., Tan, Z. 2009. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from wild rice *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 59: 1650-1655.
- Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E.T., Tan, Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1263-1267.
- Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-De Los Santos, P., Reis, V. M., Caballero-Mellado, J. 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1931-1937.
- Podschun, R., Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Review* 11: 589-603.
- Rasolomampianina, R., Bailly, X.; Fetiarison, R., Rabevohitra, R., Béna, G.; Ramarason, L., Raherimandimby, M., Moulin, L., De Lajudie, P., Dreyfus, B., Avarre, J.C. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legumes trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - and β -Proteobacteria. *Molecular Ecology* 14: 4135-4146.
- Rao, N.S.S. 1983. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 863-866.
- Radway, J.C., Santo-Domingo, J.W., Hazen, T.C., Wilde, E.W. 1998. Evaluation of biodegradation potential of foam embedded *Burkholderia cepacia* G4. *Biotechnology Letters* 20: 663-666.
- Radwan, T.S.D., Mohamed, Z.K., Reis, V.M. 2002. Production of indole-3-Acetic by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis* 32: 39-54.

- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of tall grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 43-51.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Ley, J. 1993. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-Fixing Proteobacteria Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and Description of Two Species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43: 574-584.
- Reis J.F.B., Reis, V.M. 2009. Inoculante em cana é novidade. *Campo & Negócios* 76: 31-32, 2009.
- Reis, V., Estrada-de los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., Mavingui, P., Baldani, V. L. D., Schmid, M., Baldani, J. I., Balandreau, J., Hartmann, A., Caballero-Mellado, J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2155-2162.
- Reynders, L., Vlassak, K. 1979. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasiliense*. *Soil Biology Biochemistry* 11: 547-548.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M., Triplett, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 829-836.
- Rodríguez-Díaz, M., Lebbe, L., Rodelas, B., Heyman, J., De Vos, P., Logan, N. A. 2005. *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the nifH gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 55: 2093-2099.
- Rothballer, M., Schmid, M., Klein, I., Gatteringer, A., Grundmann, S., Hartmann, A. 2006. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1341-1348.
- Roux V., Raoult D. 2004. *Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov., isolated from blood cultures. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 1049-54.
- Rudnik, P., Meletzus, D., Green, A., He, L., Kennedy, C. 1997. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biology Biochemistry* 29: 831-841.
- Ruschel, A.P. 1975. *Fixação biológica de nitrogênio*. (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Sala, V.M.R., Freitas, S.S., Donzeli, P., Freitas J.G., Gallo, P.B., Silveira, A.P.D. 2005. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 345-352.
- Santos, P.E.L., Cristales, R.B., Mellado, J.C. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2790-2798.
- Seldin, L.; Dubnau, D. 1985. DNA homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans* and other nitrogen fixing *Bacillus* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35: 151-154.
- Seldin, L., Rosado, A.S., Cruz, D.W., Nobrega, A., van Elsas, J.D., Paiva, E. 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* Strains Isolated from Rhizoplane, Rhizosphere, and Non-Root-Associated Soil from Maize Planted in Two Different Brazilian Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3860-3868.
- Seldin, L., van Elsas, D., Penido, E.G.C. 1984. *Buciffus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 451-456.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E.A.J., Salles, F., Van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Wang-Pruski, G., Nowak, J. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 55: 1187-1192.
- Siddiqui, Z.A., Mahmood, I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology* 69: 167-179.
- Sievers, M., Schlegel, H.G., Caballero-Mellado, J., Döbereiner, J., Ludwig, W. 1998. phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 505-508.

- Silva, K. 2006. *Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica*. 78f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade federal de Lavras, Lavras, Brasil.
- Sly, L.I., Stackebrandt, E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49: 541-544.
- Springer, N. Ludwig, W., Philipp, B., Schink, B. 1998. *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinoldegrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 953-956.
- Song, B., Häggblom, M.M., Zhou, J., Tiedje, J.M., Palleroni, N.J. 1999. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1129-1140.
- Sorokin, I.D., Kravchenko, I.K., Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Boulygina, E.S., Sorokin, D.Yu. 2008. *Bacillus alkalidiazotrophicus* sp. nov., a Diazotrophic, Low Salt-Tolerant Alkaliphile Isolated from Mongolian Soda Soil, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58: 2459-2464.
- Starkey, R.L., De, P.K. 1939. A new species of *Azotobacter*. *Soil Science* 47: 329-343.
- Tabacchioni, S., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Chiarini, L. 2002. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. *Annals of Microbiology* 52: 103-117.
- Tchan, Y.T. 1957. Studies of nitrogen-fixing bacteria. VI. A new species of nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the Linnean Society New South Wales* 82: 314-316.
- Tapia-Hernandez, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology* 39: 45-55.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal Microbiology* 24: 976-980.
- Thompson, J.P., Skerman, V.B.D. 1981. *Azotobacteraceae: the Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen-fixing Bacteria*. Academic Press, London, UK. 418p.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubblel, D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effects on the growth of *Pennisetum americanum* L. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 1016-1024.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1847-1852.
- Trân Van, V., Berge, O., Ngo Ke, S., Balandreau, J., Heulin, T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218: 273-284.
- Trevisan, V. 1885. Carratteri di alcuni nuovi generi di Batteriacee. *Atti della Accademia Fisica-Medica-Statistica in Milano (ser 4)* 3: 92-107.
- Tripathi, A.K., Verma, S.C. Ron, E.Z. 2002. Molecular characterization of salt tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. *Research in Microbiology* 153: 579-584
- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of American Journal* 56: 105-114.
- Urum, K., Pekdemir, T. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, 57: 1139-1150.
- Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., Igual, J.M. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1979-1983.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., De Vos, P., Willems, A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 507-512.

- Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J.J., Mahenthalingam, E., Nelis, H.J., Vandamme, P. 2004. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1011-1021.
- Victoria, L., Lovell, G. 1994. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 705-711.
- Volpin, H., Kapulnik, Y. 1994. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: Okon, Y. (ed.). *Azospirillum: plant association*. CGC Critical Reviews in Plant Science, Raton, USA. p. 111-118.
- Von Der Weid, I., Duarte, G. F., Van Elsas, J.D., Seldin, L. 2002. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 52: 2147-2153.
- Watanabe, I., Roger, P.A. 1984. Nitrogen fixation in wetland rice field. In: Subba-Rao, N.S. (ed.) *Current developments in biological nitrogen fixation*. Oxford & IBH Publishing Company, New Delhi, India. p. 237-276.
- Weber, O.B., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 2000. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2277-2285.
- Weber, O.B., Baldani, V.L.D., Teixeira, K.R.S., Kirchhof, G., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210: 103-113.
- Weber, O.B., Cruz, L.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. 2001. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 201-205.
- Whitlock, G.C., Estes, D.M., Torres, A.G. 2007. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiology Letters* 277: 115-122.
- Woese, C. 1991. The evolution of a science. In: Balows, A., Schleifer, K.H., Truper, H.G., Dworkin, M. (ed.) *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2.ed. Springer-Verlag, New York, USA. p. 3-18.
- Xie, C., Yokota, A. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1435-1438.
- Xie, G.H., Su, B.L., Cui, Z.J. 1998. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. *Acta Microbiologica Sinica* 38: 480-483.
- Yabuuchi, E., Kosato, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (PALLERONI and HOLMES, 1981) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 36:1251-1275.
- Yahalom, E., Okon, Y., Dovrat, A. 1990. Effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymorpha* L.) *Israel Journal of Botany* 40: 155-164.
- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. 1998. *Gluconacetobacter corrig.* (*Gluconoacetobacter* [sic]). In *Validation of Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*, List no. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 327-328.
- Yang, H.C., Im, W.T., Kim, K.K., An, D.S., Lee, S.T. 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 453-457.
- Yoneyama, T., Muraoka, T., Kin, T.H., Dacanay, E.V., Nakanishi, Y. 1997. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil* 189: 239-244.
- You, C.B., Zhou, F.Y., Zhang, D.D., Wang, H.X., Yaun, H.L., Yuan, H.L. 1988. In: Bothe, H., Bruijn, F.J., Newton, W.E. (ed.) *Nitrogen fixation: Hundred years after*. Gustav Fisher, New York, USA. p. 802.
- You, I.D., Fujii, T., Sano, Y., Komagata, K., Yoneyama, T., Iyama, S., Hirota, Y. 1986. Dinitrogen fixation of rice *Klebsiella* associations. *Crop Science* 26: 297-301.
- Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M.J., Arun, A.B., Lai, W.A., Rekha, P.D., Shen, F.T., Hung, M.H., Chen, W.M., Yassin, A.F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 959-963.

Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T., Kurane, R. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 743-749.

Zhou, J., Fries, M.R., Chee-Sanford, J.C., Tiedje, .M. 1995. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 500-506.

Zimmer, W., Roeben, K., Bothe, H. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta* 176: 333-342.