

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. DIAZOTROFOS DE VIDA LIVRE	6
3. DIAZOTROFOS ASSOCIATIVOS	8
3.1. ENDOFÍTICOS FACULTATIVOS	8
3.2. ENDOFÍTICOS OBRIGATÓRIOS	9
4. DIAZOTROFOS SIMBIÓTICOS.....	14
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical

Victor Augustus Marin¹
Vera Lúcia Divan Baldani²
Kátia Regina dos Santos Teixeira²
José Ivo Baldani²

1. INTRODUÇÃO

Com a exceção da água, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (Franco & Döbereiner, 1994). Além do carbono e hidrogênio, o nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável e portanto sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação.

O aumento da população neste século foi suportada, primeiro, pelo processo de Haber-Bosch (que combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como uréia), sendo necessário cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de nitrogênio em alta pressão (35 a 100 Mpa) e temperatura (300 a 400°C), com cerca de 77×10^6 toneladas de nitrogênio aplicados globalmente como fertilizante, o requerimento de combustível fóssil é cerca de 91×10^9 toneladas por ano, isto corresponde a aproximadamente 1,4% de todo o combustível fóssil consumido; e segundo, pela Revolução Verde, que é o aumento da produção de cereais associada a utilização, em doses elevadas, deste tipo de fertilizante sintético. Além do alto consumo de combustível, existem outros problemas como: a contaminação da água e alimentos por NO_3 e NO_2 , a toxicidade das plantas pela presença de altos níveis de NO_2 nos solos; alteração no

¹ Bolsista de Doutorado do CNPq

² Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ.

desenvolvimento das plantas pelo excesso de N e a emissão de CO₂ contribuindo para o aquecimento global (Bohlool et al. 1992; Döbereiner, 1992; Biological Nitrogen Fixation, 1997; Sprent & Sprent, 1990).

Portanto, considerando que a atmosfera terrestre é composta de 78% de gás dinitrogênio, a introdução do nitrogênio atmosférico, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), no circuito dos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio tem, frequentemente efeitos positivos no ambiente e na economia (Stacey et al., 1992).

O problema básico para a fixação do nitrogênio é a presença da tripla ligação $N\equiv N$, o que torna este gás extremamente estável a temperatura ambiente (Sprent & Sprent, 1990; Evans & Burris, 1992). Apesar da abundância de N₂ na atmosfera terrestre, os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos (plantas e animais) não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Portanto, a FBN é o processo pelo qual a maior parte do nitrogênio atmosférico foi incorporado à matéria viva, ao longo da evolução do nosso planeta. Ainda hoje, este processo constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. Dessa forma, a ação de microorganismos fixadores de nitrogênio e desnitrificadores garante um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados, como por exemplo o nitrato, que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente. A estimativa é de que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente varia de 139 a 170x10⁶ toneladas de nitrogênio por ano, pelo menos o dobro da fixação química (Peoples & Craswell, 1992).

Embora uma série de sistemas de fixação de nitrogênio já tenham sido descritos, a FBN é restrita aos organismos procariotos. Dentre estes organismos que fixam nitrogênio (ou diazotrofos) muitos são heterótrofos, necessitando de um

suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente da energia da luz e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto; ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente. Outros são autótrofos, os quais podem reduzir o CO₂ em presença da luz. Em geral, já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio, tais como: bactérias fotossintéticas (ex.: *Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (ex.: *Clostridium spp.*), microaeróbicas (ex.: *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.*, *Burkholderia spp.*, etc), bactérias aeróbicas (ex.: *Azotobacter spp.* e *Derxia spp.*) e também alguns representantes das cianobactérias (algas verdes-azuladas) e actinomicetos (*Frankia*) (Sprent & Sprent, 1990; Biological Nitrogen Fixation, 1997). Histórica e economicamente, vários diazotrofos tem sido amplamente utilizados como organismos modelos para investigações em laboratórios. *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* foram muito utilizados para o isolamento e caracterização da enzima nitrogenase. As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* e *Anabaena* até hoje são utilizadas como organismos modelo para os estudos de genética e bioquímica da FBN (Haselkorn et al., 1985; Postgate, 1983).

Segundo Evans & Burris (1992), podemos caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotrofos: diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

2. DIAZOTROFOS DE VIDA LIVRE

Com a exceção das bactérias fotossintéticas e cianobactérias que fixam nitrogênio, a maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas requerendo ecossistemas capazes de prover uma fonte de carbono utilizável, necessário para a fixação de nitrogênio.

Os diazotrofos de vida livre foram os primeiros a serem reconhecidos, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isoladas da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar crescidas em solos tropicais, sendo demonstrado o seu potencial na associação com gramíneas (Döbereiner & Ruschel, 1958; Döbereiner, 1959). Estas bactérias colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, em que os exudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação, pois as bactérias são encontradas principalmente em áreas onde estes compostos são liberados (Döbereiner & Alvahydo, 1959). Representantes do gênero *Beijerinckia* são aeróbicos, quimioheterotróficos, podendo crescer em solos ácidos (pH 3,0 e 4,0). A eficiência da FBN neste grupo de diazotrofos é geralmente 10 - 13 mg N/g glicose consumida em um meio livre de nitrogênio contendo 1 ou 2% de carboidrato (Becking, 1991).

Bactérias do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* da família *Enterobacteriaceae* são anaeróbicas facultativas que fixam nitrogênio, porém requerem compostos nitrogenados para crescer sob condições estritamente anaeróbicas. Entretanto, as condições para fixação de N₂ em *K. pneumoniae*, descritas por Mahl et al. (1965), revelaram que quando nitrato está presente no meio de cultivo pode ser utilizado como aceptor final de elétrons da cadeia respiratória permitindo dessa forma a geração de energia suficiente para o processo de FBN.

A família *Azotobacteraceae* é representada por dois gêneros, *Azotobacter* e *Azomonas*, sendo todos aeróbicos, heterotróficos e fixadores de nitrogênio. Dentre as espécies de *Azotobacter* conhecidas, as mais comuns são *A. chroococcum*, *A. vinelandii* e *A. paspali*, sendo esta última a mais estudada ecologicamente. *Azomonas spp.* têm sido encontradas em habitats de água corrente. Existe somente um relato na literatura sobre a ocorrência de uma espécie desse gênero em solo, a *A. macrocytogenes*, diferindo das outras espécies por utilizar como fonte de carbono manitol e maltose e por não utilizar malonato (Döbereiner et al, 1995; Becking, 1991b).

Segundo Baldani et al. (1997) a atual função das bactérias de vida livre na associação com as gramíneas é uma questão que ainda requer esclarecimento. Entretanto, somente em um caso, há uma forte evidência de que um diazotrofo de vida livre, *Azotobacter paspali*, contribua para a acumulação de nitrogênio na planta. Os resultados de Boddey et al. (1983) revelaram, através da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, que em *Paspalum notatum cv.* Batatais cerca de 20 kg de N

acumulado.ha-1.Ano-1 foi derivado da FBN, devido a associação muito específica desta gramínea com o diazotrofo rizosférico *A. paspali* (Döbereiner, 1966).

3. DIAZOTROFOS ASSOCIATIVOS

Dentro deste grupo podemos dividir os diazotrofos em dois grupos de acordo com a proposição de Baldani et al. (1997a): endofíticos facultativos (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes) e os endofíticos obrigatórios (colonizam o interior das raízes).

3.1. Endofíticos Facultativos

Somente após a redescoberta do gênero *Azospirillum* (grupo predominante nos endofitos facultativos) por Döbereiner & Day (1975), os cientistas no mundo todo mostraram interesse na associação dos diazotrofos com as gramíneas (Döbereiner & Baldani, 1982). O isolamento das espécies de *Azospirillum* como fixadores de nitrogênio se deveu a introdução de meios semi-sólidos sem N. O desenvolvimento do meio semi-sólido foi um fato muito importante para o isolamento de diazotrofos com caracter microaerofílico. No caso de *Azospirillum* e outros diazotrofos, o crescimento dependente de fixação de N₂ ocorre em regiões do meio de cultura onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias e, posteriormente, a película formada vai se deslocando até a superfície do gradiente de oxigênio, graças ao fenômeno de aerotaxia (Döbereiner et al., 1995). Os microrganismos desse gênero colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas forrageiras e cereais, sendo então chamado de diazotrofo endofítico facultativo (Döbereiner & Baldani, 1982).

A distribuição ecológica de *Azospirillum spp.* é extremamente ampla podendo ser considerada uma bactéria universal encontrada colonizando plantas crescidas em diferentes habitats (Döbereiner et al., 1976; Döbereiner & Pedrosa, 1987). Estirpes tem sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras como *Digitaria* e "*Kallar grass*" (Döbereiner et al., 1976; Haahtela et al., 1981; Reinhold et al., 1986; Rennie, 1980; Wong & Stenberg, 1979) e com as dicotiledôneas (Rao &

Vankateswarty, 1982). O gênero foi definido por Tarrand et al. em 1978 e hoje compreende seis espécies, caracterizadas com base fenotípica, análise do DNA:DNA e sequência da 16S rRNA: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (Tarrand et al., 1978), *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989) e *A. largomobile* (Dekhil et al., 1997).

Tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* utilizam malato como fonte de carbono, mas somente o primeiro consegue utilizar glicose (Baldani et al., 1997a). As duas espécies também tem a habilidade para produzir fitohormônios como IAA. Os genes para a biossíntese desse fitohormônio foram encontrados também em *A. amazonense*, mas não em *A. irakense* (Vandebroek & Vanderleyden, 1995). A habilidade para utilizar sacarose é a principal característica de *A. amazonense* e *A. irakense*, embora somente a primeira espécie seja hábil para crescer em vários pHs, sendo que para as demais espécies é requerido um pH perto do neutro. O ótimo crescimento com relação a temperatura, está entre 32 e 37°C, sendo que *A. halopraeferens* tem um crescimento ótimo a 41°C e possui tolerância às condições salinas. Complementando, *A. irakense* hidrolisa pectina e também tolera altas concentrações de sais (Baldani et al., 1997a; Döbereiner et al., 1995). Várias estirpes de *Azospirillum* reduzem nitrato a nitrito, o qual é acumulado no meio semi-sólido ou sob condições anaeróbicas, e nitrito a óxido nitroso e dinitrogênio (Döbereiner, 1991).

Segundo Baldani et al. (1997a), embora várias características ecológicas e fisiológicas estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação, estes diazotrofos, quando estão em associação com gramíneas, garantem aumentos de 5 a 30% na produção (Baldani et al., 1983; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

3.2. Endofíticos obrigatórios

Entre os diazotrofos endofíticos obrigatórios estão: *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988), *Azoarcus spp.* (Reinhold-Hurek et al., 1993), *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani, 1996; Gillis et al., 1991; Baldani et al., 1996) e *Burkholderia spp.* (Yabuuchi et al., 1992; Baldani et al., 1997b). Essa característica,

descoberta recentemente, parece ser a chave para explicar a contribuição de fixação de N₂ muito mais eficiente das associações endofíticas, especialmente nos trópicos, do que das associações rizosféricas (Döbereiner, 1995; Döbereiner et al., 1995). Além destas, outros diazotrofos de caráter anaeróbio são capazes de colonizar a endorizosfera e vasos do xilema, como *Alcaligenes faecalis* em arroz (You & Zhou, 1989) e *Pantoea agglomerans* em aveia (Ruppel et al., 1992), além de *Bacillus spp.*, *K. pneumoniae*, *Erwinia sp.*, *Enterobacter sp.* e vários outros diazotrofos (Di Fiore & Del Gallo, 1995; McInroy & Kloepper, 1995; Palus et al., 1996; Stoltzfus et al., 1997). Mas de acordo com Döbereiner e Pedrosa (1987), os diazotrofos anaeróbios apresentam baixa capacidade de conversão da energia a partir de fontes de carbono. Assim, os benefícios dessa associação parecem ser limitados pela disponibilidade de substratos orgânicos.

A. diazotrophicus é uma bactéria microaeróbia, que tem a capacidade de crescer em baixo pH (5,0 ou menos), produzir ácido acético a partir de etanol, tolerar altas concentrações de sacarose (10%) e inibir parcialmente a fixação de NH₄, especialmente em altas concentrações de sacarose (Gillis et al., 1989; Teixeira et al., 1997; Boddey et al., 1991; Stephan et al., 1991). É encontrada principalmente associada com plantas contendo alta concentração de açúcar, como cana-de-açúcar, batata-doce e capim cameroon (*Pennisetum purpureum*), todas propagadas vegetativamente (Baldani et al., 1997). Esta bactéria ocorre em números elevados no interior do colmo da cana-de-açúcar e possibilita a fixação de nitrogênio, mesmo na presença de nitrato absorvido do solo, já que não possui a redutase do nitrato. Além da cana, também foi verificada a presença de *A. diazotrophicus* em tecidos cafeeiros (Jiménez-Salgado et al., 1998). A ocorrência restrita deste diazotrófico foi confirmada pela sua completa ausência no solo e em tecidos de plantas daninhas crescidas entre e dentro das fileiras de experimentos de campo com cana-de-açúcar (Döbereiner et al., 1988). Estes resultados foram também confirmados usando primers espécie-específico desenhados para discriminar *A. diazotrophicus* de outras espécies de *Acetobacter* e outros diazotrofos (Reis et al., 1995). Outra característica única desta bactéria é a habilidade para excretar parte do nitrogênio fixado para o meio de cultura como sugerido por Cojho et al. (1993). Estes autores utilizaram levedura durante o co-cultivo com *A. diazotrophicus*, como modelo de interação diazotrofo-planta, observando acúmulo de 30 a 40% desse nitrogênio no início do crescimento, liberando depois quase metade dele para a levedura. Mais

recentemente, resultados de Cruz et al. (1995) sugerem que a amônia é o produto excretado por *A. diazotrophicus* sob condições de fixação de nitrogênio.

Foram ainda isoladas, a partir de plantas de cana-de-açúcar, dois outros diazotrofos endofíticos, descritos como *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986), que ocorre na maioria dos cereais e gramíneas forrageiras, e *H. rubrisubalbicans*, até então considerado um leve patógeno em algumas variedades de cana-de-açúcar, mas que não afeta as variedades comerciais brasileiras (Pimentel et al., 1991). A descoberta de diazotrofos endofíticos, que colonizam em números elevados raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, mudou completamente o conceito de associações rizosféricas. Esta descoberta permitiu explicar o grande potencial da contribuição dos diazotrofos para o suprimento de nitrogênio às culturas de cana-de-açúcar, pois em certas variedades dessa planta, a fixação de nitrogênio por estas bactérias pode ser suficiente para suprir três vezes a média atual da produtividade brasileira (60 t . ha⁻¹), desde que os demais nutrientes e água não sejam fatores limitantes (Franco & Döbereiner, 1994).

Representantes do gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicos, toleram drásticas mudanças no pH (5,3 – 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (Baldani et al., 1986). São também bastante semelhantes entre si, podendo, as duas espécies, serem diferenciadas através do uso preferencial de duas fontes de C: N-acetil-glucosamina e meso-eritritol. A espécie *H. seropedicae* é capaz de usar N-acetil-glucosamina como única fonte de C, sob condições de fixação de N, enquanto *H. rubrisubalbicans* usa meso-eritritol somente em meio com N mineral. As duas espécies podem também ser separadas, através do uso de sondas de oligonucleotídeos (Döbereiner et al., 1995). *H. seropedicae*, tem sido isolada de muitas gramíneas, tais como milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e de várias plantas forrageiras crescidas no Brasil (Baldani et al., 1986). Esta espécie também foi isolada de outras plantas não-leguminosas, como o dendê, sendo encontrada no interior de raízes e caules dessas plantas (Döbereiner et al., 1994; Ferreira et al., 1995). A disseminação natural de *H. seropedicae* ainda não está clara, podendo ocorrer através da propagação vegetativa, como no caso de *A. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar, ou por sementes. A disseminação por propagação vegetativa foi confirmada pela presença da bactéria em plantas de cana-de-açúcar originadas por processos de micropropagação, nos quais o meristema apical não foi cuidadosamente extraído (Olivares et al., 1996). Por outro

lado, existe a evidência de que sua disseminação pode ocorrer através de sementes, já que foram obtidos isolado de sementes de cereais como o arroz (Baldani et al., 1995). Além disso, *H. seropedicae* não sobrevive bem no solo natural, como outros endófitos, sendo sua sobrevivência menos afetada em solo estéril, o que indica que fatores biológicos interferem na sobrevivência desta bactéria. Todavia, a taxa de sobrevivência de *H. seropedicae* em ambos os solos foi mais alta do que a observada para *A. diazotrophicus* (Caruso e Baldani, 1995). A outra espécie do gênero *Herbaspirillum*, *H. rubrisubalbicans*, foi derivada da reclassificação de *Pseudomonas rubrisubalbicans*, considerada um agente fitopatogênico causador da doença conhecida como estria mosqueada em algumas variedades susceptíveis de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil (Pimentel et al., 1991). Esta espécie foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com base na homologia DNA:rRNA e em algumas características fisiológicas, como incorporação do gás $^{15}\text{N}_2$ (Gillis et al., 1991; Baldani et al., 1996). Estudos de caracterização ecológica dessa nova espécie demonstra claramente a ocorrência de *H. rubrisubalbicans* em raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar de todas as partes do mundo, sendo também encontrada em arroz e palmeira (Ferreira et al., 1995; Baldani et al., 1997a; Olivares et al., 1996).

O gênero *Azoarcus* inclui as espécies *A. indigenis*, *A. communis*, *A. tolulyticus*, *A. evansii* e alguns poucos isolados que, por não mostrarem alta homologia com estas espécies, são chamados *Azoarcus sp.*, tendo sido todos isolados de raízes de “*Kallar grass*” (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) crescidas em solos salinos do Paquistão (Reinhold-Hurek et al., 1990; Reinhold-Hurek et al., 1993; Anders et al., 1995; Zhou et al., 1995). As espécies podem ser diferenciadas através do uso de ácido p-amino benzóico (*A. indigenis*) e uso de citrato e D-alanina (*A. communis*), crescem em altas temperaturas (37-40 °C) e pH ótimo em torno de 6,5-6,8 (Döbereiner et al., 1995). Enzimas como celulases, exoglucanase e uma endoglucanase, sempre detectadas em *Azoarcus*, podem contribuir para o processo de infecção deste endófito obrigatório dentro da planta (Hurek & Reinhold-Hurek, 1994; Reinhold-Hurek et al., 1994).

A maioria do grupo II rRNA de *Pseudomonas* pertence a subclasse β de *Proteobacteria* e foi transferido recentemente para o novo gênero *Burkholderia* (Yabuuchi et al., 1992; Urakami et al., 1994; Tran Van et al., 1994; Gillis et al., 1995),

com base na sua composição celular, sequenciamento da 16S rRNA, homologia DNA:DNA e características fenotípicas (Yabuuchi et al., 1992; Yohalem e Lorbeer, 1994). Esta bactéria, que foi originalmente descrita como agente causal da podridão mole em cebola (Burkholder, 1950), tem sido encontrada em diferentes tipos de solos e raízes. Atualmente esta bactéria é considerada de grande importância devido ao seu uso no controle biológico, por apresentar antagonismo a alguns fungos e patógenos de plantas existentes no solo (McCloughlin et al., 1992), assim como por degradar alguns pesticidas (Jacobsen, 1997; Mars et al., 1996; Peñaloza-Vazquez et al., 1995). Gillis et al. (1995) transferiram *P. andropogonis* e *P. cocovenenans* para o gênero *Burkholderia*, incluindo uma nova espécie *B. vietnamiensis* (Tran Van et al., 1994) para estirpes fixadoras de N₂ isoladas da rizosfera de arroz. Além disso, dois isolados do gênero *Burkholderia*, que fixam nitrogênio, foram obtidos de amostras de material humano, e de acordo com as características genéticas, foram incluídos na espécie *B. vietnamiensis*. Da mesma forma, a ocorrência de *B. cepacia* não está apenas restrita ao solo e raízes das plantas, uma vez que também tem sido encontrada em pacientes com fibrose cística (Goldmann & Klinger, 1986) e como contaminante de soluções empregadas em práticas hospitalares (Bevivino et al., 1994). Durante o desenvolvimento dos trabalhos de levantamento ecológico de diazotróficos em plantas de arroz (Oliveira, 1992) e de mandioca (Balota, 1994), foi observada a presença de um novo microrganismo com algumas características fisiológicas semelhantes ao *Herbaspirillum*, mas apresentando características morfológicas distintas e que foi inicialmente denominado de bactéria “E” (Oliveira, 1992). No meio semi-sólido desenvolvido por Oliveira (1992), o qual continha glicose, oxalato e citrato para o isolamento de diazotrofos de raízes e colmos de arroz que utilizassem estas fontes de carbono, observou-se um crescimento lento da bactéria (Baldani et al., 1996). No entanto, como a cultura do arroz é de grande importância, Baldani (1996) decidiu fazer um trabalho mais completo sobre esta bactéria diazotrófica, que consistiu no aprimoramento do meio de cultivo, visando avaliar a ocorrência desta bactéria nas diversas partes da planta e obter dados de fisiologia e genética, que permitiram agrupá-la dentro do gênero *Burkholderia* sp. Neste novo meio (denominado JMV) foram obtidos 37 novos isolados de diferentes variedades de arroz, 10 de cana-de-açúcar e 6 de batata-doce. Essa bactéria pode ser encontrada em números relativamente altos no interior das raízes, colmos e folhas de arroz, cana-de-açúcar,

mandioca e batata-doce. A eficiência da fixação de N₂ em meio JMV semi-sólido (0,5% manitol) variou de 9,7 a 14,9 mg de N fixado/g de carbono consumido. Esta eficiência é similar a obtida por *H. seropedicae* no meio NFb, onde a eficiência variou de 12 a 15 mg de N fixado/g de malato ou 13 mg de N fixado/g de manitol consumido (Baldani et al., 1986; Baldani, 1996). Hartmann et al. (1995), verificaram através do sequenciamento parcial da 23S e 16S rDNA da estirpe PPe8, que apesar pertencer ao gênero *Burkholderia*, não se inclui na espécie *B. vietnamiensis* e, portanto, corresponde a uma nova espécie. Kirchhof et al. (1995) utilizando sequências da 23S rRNA dos isolados PPe8 e M130, também verificaram a existência de dois grupos distintos, um deles formado por 4 isolados obtidos de cana-de-açúcar e o outro formado pelos demais isolados obtidos de arroz, mandioca e batata-doce. A função deste novo endófito, na associação planta-bactéria é ainda desconhecida, e estudos mais detalhados são necessários para elucidar seu papel em comparação com outros endófitos (Baldani, 1996).

4. DIAZOTROFOS SIMBIÓTICOS

A capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente é encontrada em vários grupos de microrganismos e, em alguns casos, observa-se a formação de estruturas diferenciadas.

Em relação ao rizóbio, durante a sua associação com leguminosas, são observadas estruturas chamadas nódulos. Esses microrganismos são tipicamente hábeis para invadir as raízes de plantas leguminosas de zonas temperadas e tropicais, fazendo com que ocorra a formação do nódulo. Nos nódulos, o rizóbio, na forma pleiomórfica (bacteróide) está normalmente envolvido na fixação do nitrogênio atmosférico dentro de uma forma combinada (amônia), que pode ser utilizado pela planta hospedeira. Atualmente, são conhecidos cinco gêneros de diazotrofos da família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (Dreyfus et al., 1988; De Lajudie et al., 1994; Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996; Jarvis et al., 1997; Lajudie et al., 1998). Segundo Franco & Döbereiner (1994), as leguminosas se prestam aos mais diversos usos, sendo que a maioria das espécies de importância econômica são capazes de nodular e fixar N₂ atmosférico em condições mínimas de nitrogênio. A taxa de fixação varia com a espécie, mas é geralmente limitada pelas condições

abióticas do solo, como: a acidez do solo (Wolff et al., 1991; Anyango et al., 1995), o tipo de solo, textura e composição (Heijnen et al., 1993), temperatura e umidade (Wolff et al., 1991; Hungria et al., 1993) e metais pesados (Hirsch et al., 1993). Entretanto, em condições favoráveis, inoculando com o rizóbio específico, corrigindo deficiências dos demais nutrientes e adequando a espécie às condições edafopedoclimáticas, altas taxas de fixação podem ser obtidas. Os rizóbios podem ser isolados dos nódulos, mas não são facilmente identificados quando isolados do solo (Elkan & Bunn, 1992). Tradicionalmente, se tem dividido os rizóbios em grupos, de acordo com a velocidade de crescimento, como primeiro sugerido por Lonis & Hansen (1921), os de crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são aeróbicas, gram-negativas, usualmente produzem poli- β -hidroxibutirato, são móveis, temperatura ótima de crescimento entre 25-30 oC e pH 6-7. Algumas estirpes, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4-42,5 oC) e pH (4,5-9,5). São quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás. Celulose e amido não são utilizados. Produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais e manitol ou outros carboidratos e reação alcalina oriunda de uma reação proteolítica. Sais de amônio, nitrato, nitrito e muitos aminoácidos podem servir como fontes de nitrogênio. Peptona é pobremente utilizada. Caseína e ágar não são hidrolizados (Jordan, 1984). As espécies pertencentes a este gênero são *R. leguminosarum* (Jordan, 1984), *R. galegae* (Lindstrom, 1989), *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997) e *R. hainanense* (Chen et al., 1997).

O gênero *Bradyrhizobium* possui características semelhantes ao gênero *Rhizobium* diferindo nos seguintes aspectos: a reação que ocorre em meio contendo sais minerais e manitol é alcalina e, algumas estirpes podem crescer quimiolitotroficamente na presença de H₂, CO₂ e baixos níveis de O₂ (Jordan, 1984). Arabinose tem sido a fonte de carbono preferida para muitas estirpes (Elkan & Kuykendall, 1981). Este gênero possui três espécies: *B. japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992) e *B. lianinense* (Xu et al., 1995), todos

nodulando *Glycine*. Há ocorrência de nodulação em uma planta não-leguminosa denominada *Parasponia*, membro da família *Ulmaceae*, com o gênero *Bradyrhizobium* (Trinick, 1979; Trinick, 1989).

O gênero *Azorhizobium* compreende apenas uma espécie *A. caulinodans*, capaz de nodular a raiz e caule de *Sesbania rostrata* (Dreyfus e Dommergues, 1981). Ao contrário de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, este gênero não assimila açúcares (exceto glicose). Pode fixar nitrogênio no estado de vida livre. Assimila álcoois como 1,2-propanediol e 2,3-butanediol. As células são gram-negativas, móveis e fixam nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas, requerendo ácido nicotínico para esta fixação. Testes para oxidase e catalase tem resultados positivos e urease negativo. Ácidos orgânicos como lactato ou succinato são os substratos favoritos como fonte de carbono para crescimento dependente de NH_4^+ e N_2 , sendo que malonato também é utilizado. Amido não é hidrolizado, não oxida manitol e nem desnitrifica. O crescimento ocorre de 12 a 43 oC e pH de 5,5 a 7,8, sendo que o crescimento pode ocorrer na presença de prolina. (Dreyfus et al., 1988).

O gênero *Mesorhizobium* possui estirpes com células gram-negativas, aeróbicas, móveis (apresentam flagelo) podendo conter poli- β -hidroxibutirato. Todas as espécies assimilam glicose, raminose e sacarose metabolizando-os em produtos ácidos. O pH ideal para crescimento está entre 4,0 e 10,0 e temperatura entre 37 a 40 oC. Até o presente momento foram descritas as espécies *M. loti* (nodulando *Lotus*), *M. huakuii* (nodulando *Astragalus sinicus*), *M. ciceri* e *M. mediterraneum* (nodulando *Cicer arietinum*), *M. tianshanense* (Jarvis et al., 1997; Lindström, et al., 1995; Young & Haukka, 1996), *M. amorphi* (nodulando *Amorpha* sp.) (Lindstrom et al., 1998) e *M. plurifarum* (nodulando *Cicer*) (Lindstrom et al., 1998).

No gênero *Sinorhizobium* as células usualmente contém grânulos de poli- β -hidroxibutirato, são gram-negativas, aeróbicas e móveis. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 30 oC, mas muitas estirpes crescem a 35oC e outras a 10oC, o pH ótimo está entre 6 e 8, porém algumas estirpes crescem em pH 5 e outras em pH 10,5. As bactérias são quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos (mas não celulose e amido) e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono. Cloreto de amônio e nitrato ao invés de aminoácidos são preferidos como fonte de nitrogênio, mas algumas estirpes utilizam certos aminoácidos. Peptona não é muito utilizada e não ocorre a produção de 3-cetolactose a partir de lactose. Todas

as estirpes requerem pantotenato e ácido nicotínico, mas suas reações a outras vitaminas são variáveis e todas produzem citocromo oxidase e catalase. As células produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais com várias carboidratos. O gênero possui as seguintes espécies: *S. meliloti* (nodulando *Medicago*) *S. fredii* (*Glycine*) *S. saheli*, *S. teranga* (*Acacia*) (Chen et al., 1988; De Lajudie et al., 1994) e *S. medicae* (nodulando *Medicago polymorpha*) (Brunell et al., 1998).

O novo gênero *Allorhizobium* está representado pela espécie *A. undicola*, bactéria fixadora de nitrogênio capaz de formar nódulos no caule de *Neptunia natans*, uma leguminosa tropical de ocorrência no Senegal (Lajudie et al., 1998). Foi demonstrado que este grupo é fenotipicamente e filogeneticamente separado das espécies descritas anteriormente, sendo o seu vizinho mais próximo, o *Agrobacterium vitis*, com 96,2% de homologia, deduzido pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. As células são gram-negativas, aeróbicas e móveis, quimiorganotróficas e utilizam uma série de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono para crescimento. Várias características discriminativas podem ser usadas para diferenciar *A. undicola* dos outros gêneros que nodulam as leguminosas. Em particular, o crescimento em adonitol, N-acetil-glucosamina, D-melibiose, D-rafinose, L-fucose, gluconato, butirato, glutarato, DL-glicerato, L-tartarato, citrato e L-ornitina. Entretanto, 3-cetolactose não é produzido a partir de lactose. Crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de polissacarídeos. Estirpes de *A. undicola* podem formar nódulos e fixar nitrogênio em *Neptunia natans*. Pode também nodular *Medicago sativa*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, *Lotus arabicus* e *Faidherbia albida*, mas os nódulos nem sempre fixam nitrogênio. Nenhuma estirpe foi encontrada capaz de nodular *Sesbania rostrata*, *Sesbania pubescens*, *Sesbania grandiflora*, *Vigna unguiculata* ou *Macroptilium atropurpureum* (Lajudie et al., 1998).

Além dos rizóbios, bactérias pertencentes ao gênero *Frankia*, também fazem simbiose com diversas plantas. Essas bactérias são aeróbicas ou microaerofílicas, gram-positivas, embora as células mais velhas podem ser gram variável, pertencendo a ordem *Actinomycetales*, uma ordem de bactérias filamentosas, sendo a simbiose chamada de actinorriza. As principais plantas que participam da simbiose com *Frankia* são do gênero *Alnus*, *Casuarina* e *Elaeagnus*. Há uma grande diversidade de plantas noduladas por *Frankia* incluindo mais de 200 espécies

distribuídas em 24 gêneros de oito famílias (Stacey et al., 1992; Kuss-Danell, K., 1997). *Frankia* tipicamente produz um micélio vegetativo composto de filamentos septados, sendo que neste micélio podem ser produzidos dois tipos de células, a vesícula, a qual é o sítio da fixação de nitrogênio (Meesters et al., 1987) e o esporo, desenvolvido no esporângio, e que pode persistir no solo por um longo tempo (ex.: 30 meses) (Tortosa & Cusato, 1991). Há uma grande dificuldade em se isolar este microrganismo, devido ao seu crescimento muito lento em comparação com os demais microrganismos do solo. O meio para o seu isolamento não contém nitrogênio e é composto de sais inorgânicos simples com solução de propionato de sódio como fonte de carbono (Baker, 1989). Os ácidos orgânicos tem mostrado ser melhores fontes de carbono para muitas espécies, com succinato, piruvato e propionato sendo os melhores e muitos açúcares podem ser utilizados. As diferentes estirpes podem diferir em sua velocidade de crescimento em diferentes fontes de carbono (Baker & Mullin, 1992). Algumas estirpes produzem enzimas como celulase, pectinase e proteinase em culturas puras (Benson & Silvester, 1993). O processo de infecção por *Frankia* inicia como uma relação simbiótica com a planta hospedeira podendo ser de dois tipos, infecção de raízes e infecção via penetração intercelular, sendo estes modos análogos aos observados nos legumes simbióticos (Miller & Baker, 1986; Sprent, 1989). Ao contrário dos nódulos dos legumes que são limitados por oxigênio, nódulos actinorrizais mostram máxima velocidade de fixação de nitrogênio em níveis atmosféricos de oxigênio (Gauthier et al., 1981). Plantas actinorrizais (como os gêneros *Alnus spp.*, *Comptonia*, *Myrica*, *Coriaria* e *Datisca spp.*, *Gymnostoma*, etc) são mais numerosas e possuem maior diversidade em regiões temperadas, onde são frequentemente encontradas em solos pobres em nitrogênio (Baker & Mullin, 1992).

Uma outra simbiose de grande importância é a que ocorre entre as cianobactéria e várias plantas. Elas são procariotos gram-negativos, que fazem fotossíntese com aspectos muito similares as plantas superiores. Possuem células especializadas em fixar nitrogênio, os heterocistos, pois a cianobactéria faz na mesma célula a fotossíntese (processo oxigênico) e a fixação de nitrogênio (processo sensível ao oxigênio). No caso de simbiose entre cianobactérias e plantas podemos citar como plantas hospedeiras as angiospermas (gênero *Gunnera*), gimnospermas (cicádias), pteridófitas (*Azolla*), briófitas (gênero *Anthosceros*, *Blasia*, *Cavicularia* e *Sphagnum*), sendo que a maior parte das associações, são de

espécies dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. Além disso, fungos e algas formadoras dos líquens constituem alguns exemplos de simbiose (gênero *Collema*, *Peltigera*, *Leptogium*, etc), (Schenk, 1992; Sprent & Sprent, 1990; Stacey et al., 1992).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação prática da FBN em gramíneas ainda é incipiente, porém grandes avanços tem sido obtidos em termos da identificação da contribuição da FBN e a manipulação das associações bactérias fixadoras de nitrogênio com as gramíneas visando aumentar sua eficiência. As pesquisas conduzidas no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia já levaram a identificação de nove espécies de bactérias diazotróficas. Dentre as espécies de bactérias diazotróficas que colonizam raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, estão o *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Burkholderia brasilensis*. O nitrogênio oriundo da FBN em cana-de-açúcar é de até 60%, ocasionando uma economia de R\$ 150 milhões em fertilizantes nitrogenados. Mesmo assim, ainda não se conhece a(s) bactéria(s) responsável pela FBN em cana.

Nas leguminosas, a FBN associada a soja é a de maior expressão, podendo ser estimado que na condição brasileira quase 2 bilhões de dólares tem sido economizados anualmente com a FBN. Isto se deve em boa parte ao melhoramento vegetal direcionado para uma maior contribuição da FBN e de diversos trabalhos de seleção de rizóbios adaptados às condições dos solos brasileiros. No caso de outras leguminosas como o feijão, foram isoladas estirpes que são tolerantes a acidez e a altas temperaturas podendo a inoculação com estas estirpes duplicar a média da produtividade nacional. Entretanto, nem sempre as respostas a inoculação são positivas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.4, p.996-1006, 1997.

- ANDERS, H.-J. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.2, p.327-333, 1995.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.11, p.4016-4021, 1995.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.36, n.1, p 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.53-54.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMAN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Hesbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.46, n.3, p.802-810, 1996.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997.

- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* ssp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 234p. Tese de Doutorado.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A. de B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, n.1, p.35-46, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.869-881, 1983.
- BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. In rice root system. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts...** Santos: International Committee on Microbial Ecology, 1995. p.133.
- BAKER, D.D. Methods for the isolation, culture, and characterization of the Frankiaceae: Soil actinomycetes and symbionts of actinorhizal plants. In: LABEDA, D., ed. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature.** New York: McGraw-Hill, 1989. p.213-236.
- BAKER, D.D.; MULLIN, B.C. Actinorhizal symbioses. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological Nitrogen Fixation.** New York: Chapman, 1992 p.259-292.
- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz).** Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 281p. Tese de Doutorado.
- BECKING, J.H. The Genus *Beijerinckia*. In: BALOWS, A.; TRIPPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIDER, K.-H., ed. **The prokaryotes.** 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1991a. p. 2254-2267.
- BECKING, J.H. The Family *Azotobacteraceae*. In: Balows, A.; Tripper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleider, K.-H., ed. **The prokaryotes.** 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1991b. p. 3144-3170.

- BENSON, D.R.; SILVESTER, W.B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, Washington, v.57, n.2, p.293-319, 1993.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, New York, v.140, n.5, p.1069-1077, 1994.
- BIOLOGICAL nitrogen fixation: the global challenge & future needs. Lake Como, Italy: A position paper, discussed at The Rockefeller Foundation Bellagio Conference Centre, 1997. 83p.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N 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**, Ottawa, v.29, n.8, p.1036-1045, 1983.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.111-117, 1991.
- BOHLOOL, B.B.; LADHA, J.K.; GARRITY, D.P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, n.1, p.1-11, 1992.
- BRUNELL, B.; ROME, S.; CLEYET-MAREL, J.C. Symbiotic and genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* populations associated with *Medicago* spp. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E., ed. **Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century**; proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Institut Pasteur, Paris, France, July 20-25, 1997. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.585. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, v.31).
- BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St. Paul, v.40, p.115-117, 1950.
- CARUSO, L.V.; BALDANI, J.I. Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using LacZ-fusion. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.108.

- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, n.1, p.23-31, 1988.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.3, p.870-873, 1997.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.38, n.4, p.392-397, 1988.
- COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHENBERG, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyloytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.106, n.3, p.341-346, 1993.
- CRUZ, L.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, J.I. Expressão fenotípica de estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* contendo o gene nifA de *Azotobacter vinelandii*. In: Reunião Anual De Genética De Microorganismos, 20.; 1995, São Paulo, **Anais...** São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p.116.
- DEKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the Genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v.20, n.1, p.72-77, 1997.
- DeLAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.48, p.1277-1290, 1998.
- DeLAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal Systematic of Bacteriology**, Baltimore, v.44, p.715-733, 1994.

- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. eds. **Azospirillum VI and related microorganisms: genetic, physiology and ecology**. New York: Springer-Verlag, 1995. p.169-187. (NATO ASI Serie G. Ecological Sciences, v.37).
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.1, p.357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.3-4.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: SKINNER; F.A.; BODDEY; R.M.; FENDRIK, I. eds. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic, (Developments in Plant and Soil Sciences, 35). 1989, p.103-108.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.251-258, 1959.
- DÖBEREINER, J. The Genus *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALOWS, A.; TRIPPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIDER, K.-H. eds. **The prokaryotes**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1991, p.2236-2253.
- DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II-Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.34, n.7, p.869-881, 1982.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995, 60p.

- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MORRIB, M., eds. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: The American University, 1994, p.395-408.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J., ed. **Nitrogen fixation**; proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Pullman: Washington State University, 1975. v.2. p. 518-538.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976.
- DÖBEREINER, J. REIS, V.M.; LAZARINI, A.C. New N₂-fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In: BOTHE, H.; BRUIJIN, F.J. de; NEWTON, W.E. eds. **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fisher, p.717-722, 1988.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v.1, p.261-272, 1958.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Springer-Verlag, 1987. 155p.
- DREYFUS, B.; DOMMARGUES, Y.R. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume, *Sesbania rostrata*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.10, p.313-317, 1981.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.38, n.1, p.89-98, 1988.
- ELKAN, G.H.; BUNN, C.R. The Rhizobia. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. eds. **The prokaryotes**. 2ed., v.3 New York: Springer-Verlag, 1992, p.2197-2213.
- ELKAN, G.H.; KUYKENDALL, L.D. Energy metabolism in *Rhizobium*. In: BROUGHTON, W.J. ed. **Ecology of nitrogen fixation**. Oxford: Oxford University Press, 1981. p.145-166.

- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.
- FERREIRA, A.C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A.R.V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.210.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v.7, p.332-346, 1889.
- GAUTHIER, D.L.; DIEM, H.G.; DOMMERGUES, Y. In vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from Casuarina nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.306-308, 1981.
- GILLIS, M.; VAN VAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K. HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to a new 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**, Baltimore, v.45, n.2, p.274-289, 1995.
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, P.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationship between (*Pseudomonas*) *Rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *Autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. eds. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p.293-294.
- GILLIS, M.; KERSTERS, K., HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPRENSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.39, n.3, p.361-364, 1989.

- GOLDMANN, D.A.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.108, p.806-812, 1986.
- HAAHTELA, K.; WAARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.203-206, 1981.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; ABMUS, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. de. eds. **Azospirillum VI and related microorganisms**: genetics, physiology, ecology. Berlin: Springer, 1994. p.415-427. (NATO ASI series. Series G, Ecological Sciences, 37).
- HASELKORN, R.; GOLDEN, J.W.; LAMMERS, P.J.; MULLIGAN, M.E. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985, p.485-490.
- HEIJNEN, C.E.; BURGERS, S.C.G.E.; VAN VEEN, J.A. Metabolic activity and population dynamics of rhizobia introduced into unamended and bentointe-amended loamy sand. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.3, p.743-747, 1993.
- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; MC GRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.11, p.1485-1490, 1993.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of *Azoarcus* spp grass-associated diazotrophs, by analysis of partial 16S rRNA sequences. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: The American University, 1994. p.59-68.
- JACOBSEN, C.S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4D contaminated soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.189, n.1, p.139-144, 1997.

- JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.3, p.895-898, 1997.
- JIMÉNES-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARÚA-ESPERZA, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.9, p.3676-3683, 1998.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. eds. **Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology**, v.1 Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, p.234-256.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.32, n.1, p.136-139, 1982.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KIRCHHOF, G.; SPRINGER, N.; SMIDA, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Use of molecular methods for identification and “in situ” studies of diazotrophic plant colonizing bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstract...** Santos: International Committee on Microbial Ecology, 1995. p.92.
- KUSS-DANELL, K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. **New Phytologist**, New York, v.136, n.3, p.375-405, 1997.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan. 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.38, n.6, p.501-505, 1992.
- LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legumes root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.39, n.3, p.365-367, 1989.

- LINDSTROM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; DE LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.-X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. eds. **Biological Nitrogen Fixation for the 21st century**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.559-570.
- LINDSTRÖM, K.; VAN BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. eds. **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.807-810.
- LOHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal Agricultural Research**, Washington, v.20, p.543-556, 1921.
- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.
- MAHL, M.C.; WILSON, P.W.; FIFE, M.A.; EWING, W.H. Nitrogen fixation by members of the tribe *Klebsielleae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.89, p.1482-1487, 1965.
- MARS, A.E.; HOUWING, J.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B. Dgradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.3, p.886-891, 1996.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.
- MCLOUGHLIN, F.J.; QUINN, J.P.; BETTRMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.5, p.1760-1763, 1992.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.173, n.2, p.337-342, 1995.
- MEESTERS. T.M.; VAN VLIET, M.W.; AKKERMANS, A.D.L. Nitrogenase is restrited to the vesicles in *Frankia* strain EAN1pec. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.70, n.2, p.267-271, 1987.

- MILLER, I.M.; BAKER, D.D. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. **Protoplasma**, New York, v.131, n.1, p.82-91, 1986.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, n.12, p.1591-1601, 1994.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophic *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, n.3, p.197-200, 1996.
- OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 96p., 1992. Tese de Mestrado
- PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Hbts and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, n.1, p.135-142, 1996.
- PEÑALOZA-VAZQUEZ, A.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; BAILEY, A.M. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.2, p. 538-543, 1995.
- PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.C.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.61-65, 1991.
- POSTGATE, J.R. **The fundamental of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 252 p., 1983.
- RAO, A.V.; VANKATESWARLU, B. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the indian desert. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, n.7, p.778-782, 1982.

- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Diazotrophs repeatedly isolated from roots of Kallar grass form a new genus, *Azoarcus*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.L. eds. **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, p.432, 1990.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *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 Bacteriology**, Baltimore, v.43, n.3, p.574-584, 1993.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMAN, E.G.; FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zone of Kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.3, p.520-526, 1986.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.37, n.1, p.43-51, 1987.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; VLAEYSSSENS, M.; VAN MONTAGU, M. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, n.21, p.7056-7065, 1994.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. Development of a molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* species and detect their occurrence in sugar cane and other plants grown in the field. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.130
- RENNIE, R.J. Dinitrogen-fixing bacteria: computer assisted identification of soil isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.26, n.11, p.1275-1283, 1980.

- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISE and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.145, n.2, p.261-273, 1992.
- SCHENK, H.E.A. Cyanobacterial symbioses. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H. **The prokaryotes** – A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2ed. vol IV New York: Springer-Verlag, 1992, p.3819-3854.
- SEGOVIA, L. YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.43, n.2, p.374-377, 1993.
- SPRENT, J.I. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules. **New Phytologist**, New York, v.111, n.2, p.129-153, 1989.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2ed., 1990. 256p.
- STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. 943p.
- STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETZ, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.77, p.67-72, 1991.
- STOLTZFUS, J.R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUJIN, F.J. de. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potencial for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, n.1, p.25-36, 1997.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

- TEIXEIRA, K.R.S. *Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-açúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene *nifA*, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997. 152p. Tese de Doutorado.
- TRAN VAN, V.; GILLIS, M.; HEBBER, K.P.; FERNANDEZ, M.; SEGERS, P.; MARTEL, M.H.; BERGE, O.; MEYER, J.M.; HEULIN, T. Isolation from the rice rhizosphere of a new species of nitrogen-fixing Proteobacteria, belonging to the genus *Burkholderia*. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. eds. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: American University in Cairo Press, 1994. p.299-309.
- TORTOSA, R.D.; CUSATO, M. Effective nodulation of rhamnaceous actinorhizal plants induced by air dry soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.131, n.2, p.229-233, 1991.
- TRINICK, M.J. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.25, n.5, p.565-578, 1979.
- TRINICK, M.J.; HADOBAS, P.A. Competition by *Bradyrhizobium* strains for nodulating of the nonlegume *Parasponia andersonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.5, p.1242-1248, 1989.
- URAKAMI, T.; ITO-YOSHIDA, C.; ARAKI, H.; KIJIMA, T.; SUZUKI, K.-I.; KOMAGATA, K. Transfer of *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.44, p.235-245, 1994.
- VANDEBROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. The genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, n.5, p.445-466, 1995.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.12, n.3, p. 170-176, 1991.
- WONG, P.; STENBERG, N.E. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of harvested sorghum plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.1189-1191, 1979.

- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. 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**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.
- YOHALEM, D.S.; LORBEER, J.W. Intraespecific metabolic diversity among strains of *Burkholderia cepacia* isolated from decayed onions, soils and clinical environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v.65, p.111-131, 1994.
- YOU, C.; ZHOU, F. Non-nodular endorhizosphere nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, n.3, p.403-408, 1989.
- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, New York, v.133, n.1, p.87-94, 1996.
- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.4, p.706-711, 1995.
- ZHOU, J.; FRIES, M.R.; CHEE-SANFORD, J.C.; TIEDJE, J.M. 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**, Baltimore, v.45, n.3, p.500-506, 1995.