



**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS  
ISOLADAS DE SOLOS EM REABILITAÇÃO  
APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA**

**RAFAELA SIMÃO ABRAHÃO NÓBREGA**

**2002**



RAFAELA SIMÃO ABRAHÃO NÓBREGA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ISOLADAS DE SOLOS EM  
REABILITAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição Mineral de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Fátima M.S. Moreira

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2002

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Nóbrega, Rafaela Simão Abrahão

Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. -- Lavras : UFLA, 2002.

71p. : il.

Orientadora: Fátima M. S. Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Azospirillum sp. 2. Herbaspirillum sp. 3. Burkholderia sp. 4. Perfil de  
proteína total. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46

**RAFAELA SIMÃO ABRAHÃO NÓBREGA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ISOLADAS DE SOLOS EM  
REABILITAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA**

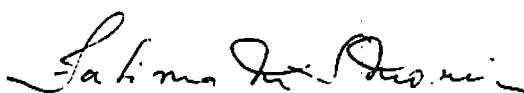
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 19 de agosto de 2002**

Prof. José Oswaldo Siqueira.....UFLA/DCS

Pesq.: José Ivo Baldani.....EMBRAPA/Agrobiologia

Prof. Ricardo Magela de Souza .....UFLA



Prof.<sup>a</sup> Fátima M. S. Moreira

UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

**Aos meus pais, Antônio e Maria de Lourdes pelo incentivo e amor a mim dedicados e por tudo que fizeram para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida. Aos meus segundos pais, Euclides e Maria de Lourdes**

## **OFEREÇO**

**A Deus por tudo.  
Ao meu esposo Júlio César pelo amor,  
companheirismo, cumplicidade e  
presença em minha vida....**

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

À professora Fátima M.S. Moreira, pela oportunidade de ingresso na iniciação científica, pelo incentivo, apoio, amizade, orientação e compreensão incondicionais ao longo do Curso de Mestrado;

A todos os professores do Departamento de Ciência do Solo, pelos conhecimentos transmitidos e pela atenção dada em todos os momentos;

Aos membros da banca examinadora, Prof. José Oswaldo Siqueira, Pesq. José Ivo Baldani, Prof. Ricardo Magela de Souza e Prof. Fátima Maria de Souza Moreira, pelas críticas e sugestões apresentadas para o melhoramento deste trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Ciência do Solo, pela ajuda imprescindível, especialmente a Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pela amizade e pela valiosa ajuda na execução de parte das análises;

A todos que participaram de forma direta ou indireta na execução deste trabalho;

A todos os colegas de curso e principalmente aos amigos do Departamento de Ciência do Solo, pela amizade e agradável convivência durante o decorrer do curso;

À Adriana S. Lima, pela valiosa amizade e pela contribuição em parte da realização das análises;

À minha família, pelo amor, confiança e apoio, tão presentes e importantes, mesmo na distância.

## SUMÁRIO

### Página

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Reabilitação de áreas mineradas.....	3
2.2 Taxonomia, ocorrência e contribuição das bactérias diazotróficas associativas.....	6
2.2.1 Gênero <i>Azospirillum</i> .....	7
2.2.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	11
2.2.3 Gênero <i>Burkholderia</i> .....	13
2.3 Características morfológicas e fenotípicas para estudo de diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Estirpes de bactérias diazotróficas.....	20
3.2 Caracterização em meio de cultivo GNA e teste gram.....	23
3.3 Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultura batata modificado.....	23
3.4 Avaliação da forma das células em microscópio ótico.....	24
3.5 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Caracterização em meio de cultivo GNA e teste gram.....	28
4.2 Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultura batata modificado.....	36
4.3 Avaliação da forma celular em microscópio ótico.....	39
4.4 Análise de proteínas totais (eletroforese em gel de poliacrilamida ) .....	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6 CONCLUSÕES.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	62



## RESUMO

**NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\***

Gramíneas, usadas comumente para reabilitação de áreas degradadas, podem formar associações em suas raízes com bactérias fixadoras de nitrogênio e assim contribuir para a sustentabilidade do ecossistema. Por outro lado, a diversidade microbiana exerce papel relevante na resiliência dos processos biológicos no solo, que incluem a fixação biológica de  $N_2$ . Este trabalho teve como objetivo a caracterização fenotípica de 72 isolados de bactérias diazotróficas associativas Gram-negativas, oriundos de áreas sob diferentes estratégias de reabilitação. Estirpes tipo de espécies de *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia* foram usadas com referência, uma vez que os meios de cultura usados para o isolamento dos diazotróficos são considerados seletivos para estas espécies. O dendrograma de similaridade baseado em 7 características morfológicas culturais dos isolados em meio GNA revelou grande diversidade sendo obtidos 50 grupos a 81 % de similaridade. A tolerância a NaCl em meio batata/sacarose/ácido málico variou de 0 a 50 g L<sup>-1</sup>, permitindo separar os isolados e as estirpes tipo em 5 grupos. O diâmetro celular variou de 0,61 a 1,21  $\mu$ m, sendo que 13 isolados não apresentaram similaridade com as estirpes tipo. Os perfis de proteína total, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram bastante diversos, sendo formados 18 grupos com similaridade a 75%. Houve relação entre grupamento fenotípico de proteína total com caracterização morfológica celular. Os meios de cultivo Fam e JNFb detectaram, além das espécies alvo, outras espécies não identificadas. A alta diversidade fenotípica dos isolados, assim como sua dissimilaridade com as estirpes-tipo, indicam que estes podem representar novas espécies.

---

\* Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Fátima M. S. Moreira – UFLA.

## ABSTRACT

**NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão. Phenotypic characterization and diversity of diazotrophic associative bacteria isolated from soils rehabilitated after bauxite mining. Lavras: UFLA, 2002. p. 71 (Dissertation – Master of Science in Soil and Plant Nutrition).\***

Grass species commonly used for the rehabilitation of degraded areas can establish root associations with diazotrophic bacteria and hence contribute to ecosystem sustainability. On the other hand, microbial diversity play an important role on the resilience of biological processes, including N<sub>2</sub> fixation. This work aimed the phenotypic characterization of 72 diazotrophic Gram-negative bacteria, isolated from areas under different rehabilitation strategies. Type strains of *Herbaspirillum*, *Azospirillum* and *Burkholderia* species were included as references as the media used for isolation are considered selective to these species. The similarity dendrogram based on 7 morphological cultural characteristics on GNA showed great diversity as 50 groups were formed at 81% similarity. Tolerance to NaCl at potato/sucrose/acid malic medium varied from 0 to 50 g L<sup>-1</sup>, and allowed to separate isolates and type strains into 5 groups. Cell diameter varied from 0,61 to 1,21 µm among the isolates being 13 of them not similar to type strains. Eighteen groups at 75% similarity were formed based on profiles obtained by polyacrilamide gel electrophoresis of total proteins (SDS-PAGE). There was relationship between phenotypic grouping of total protein profiles and cellular morphology. Fam and JNFb detected the target species and unidentified ones. The high phenotypic diversity as well as the high dissimilarity among isolates and type strains indicate they can represent new species.

---

\* Adviser: Fátima M. S. Moreira – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é mediada por ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo 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, 2002).

Em geral, espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas (Magalhães & Döbereiner, 1984; Döbereiner, 1992; Baldani et al., 1997), de tubérculos (Paula, 1992; Balota, et al., 1997), cafeeiros (Jiménez-Salgado et al., 1998; Santos et al., 2001), e fruteiras (Rao, 1983; Weber et al., 1999). Há relatos também de ocorrência em solos contaminados com metais pesados (Lange et al., 1998), em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólido industrial (Melloni et al., 2000; Motta et al., 2001), entre outros ecossistemas.

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 não constitui fator limitante às plantas. Já em solos e substratos pobres ou desprovidos de matéria orgânica, como os de áreas mineradas, a FBN é torna-se importante, pois, o N é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento vegetal em áreas degradadas (Franco & Faria, 1997).

Estimativas da FBN em gramíneas como *Brachiaria decumbens* e *B. humidicula*, as quais são muito utilizadas para a revegetação de áreas degradadas, indicam valores de 30 a 45 Kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> 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.

Ao avaliar a ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associativas em áreas de mineração de bauxita sob diferentes estágios de reabilitação Melloni et al. (submetido, 2002), encontraram densidades variando de  $6,0 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  solo a  $5,7 \times 10^2$  células  $g^{-1}$  solo, utilizando o meio de cultivo NFb semi-sólido (seletivo para o gênero *Azospirillum*). Com os meios JNFb (seletivo para *Herbaspirillum* spp.) e Fam (seletivo para *Azospirillum amazonense*) encontraram densidades de  $3,6 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  a  $2,1 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  de solo,  $1,99 \times 10^4$  células  $g^{-1}$  a  $1,7 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  de solo, respectivamente. Deste trabalho foram obtidos 72 isolados de bactérias associativas, cuja caracterização fenotípica foi o objetivo do presente estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Reabilitação de áreas mineradas

A preocupação atual com o ambiente tem colocado em destaque a degradação dos recursos naturais edáficos, hídricos, fauna e flora. No caso do solo, sua degradação tem-se intensificado nas últimas décadas, sendo que atualmente cerca de 15% do solo no mundo ( $1.966 \times 10^6$  ha) encontra-se degradado (Oldeman, 1994). No Brasil, sabe-se que a degradação do solo é intensa, mas a extensão é ainda pouco avaliada. De acordo com Dias & Griffith, (1998) os principais responsáveis pela degradação dos solos brasileiros são: as atividades de mineração, construção civil, agricultura e pecuária intensiva, quando realizadas de formas inadequadas. Dentre as atividades degradadoras, a mineração é uma das que causam grande impacto ambiental, pelas alterações que provoca na superfície terrestre, mas esta é geralmente em áreas restritas (pequenas). Contudo, a indústria mineradora exerce grande importância na economia de um país, pois, várias atividades econômicas básicas, encontram-se intrinsecamente ligadas a ela, como siderurgia, metalurgia, petroquímica, carboquímica, indústrias de materiais de construção, dentre outras. No processo extrativo é necessário construções de estradas de acesso à mina, remoção da cobertura vegetal e da camada superficial do solo, com posterior revolvimento de todo o perfil que se encontra acima da rocha a ser explorada (MINTER-IBAMA, 1990). Como consequência dessa atividade, os solos de áreas mineradas apresentam geralmente propriedades físicas e químicas adversas ao crescimento vegetal como: aeração inadequada, baixa taxa de infiltração de água; superfície rugosa, extrema deficiência de nutrientes, metais pesados em níveis tóxicos, salinidade, ampla variação de temperatura e baixos valores de pH. Essas alterações podem ter efeitos direto ou indireto sobre as plantas (Poggiani & Monteiro, 1990), densidade e diversidade de microrganismos

(Walland & Allen, 1987; Biro et al., 1993; Melloni, 2000), comprometendo a funcionalidade do ecossistema.

No Brasil, os primeiros trabalhos de recuperação de áreas degradadas desenvolvidos por empresas de mineração, datam do início da década de 70 e foram conduzidos, na maioria, mediante o emprego de espécies exóticas (Barth, 1989; Willians & Moraes, 1992), como as das espécies do gênero *Eucalyptus* e *Pinus*, sobre as quais as informações ecológicas e silviculturais são mais difúndidas quando comparadas às espécies nativas (Nappo et al., 1999). Atualmente, a legislação brasileira submete o empreendedor do processo de mineração a recuperar o ambiente degradado. A recuperação visa dar uma forma de utilização a área degradada, que nem sempre envolve o restabelecimento dos processos biológicos do solo. Entretanto, quando o plano de recuperação prevê o restabelecimento do equilíbrio biológico da área, variáveis como estabelecimento de um solo mais fértil, seleção de espécies nativas, que possam desencadear um processo natural de sucessão, e a reintrodução da fauna deverão ser consideradas (Miranda et al., 1998). Além de ser uma exigência legal, observa-se também um aumento do interesse das empresas de mineração em definir metodologias de recuperação que sejam adequadas às condições do local de desenvolvimento da extração do bem mineral (Martins et al., 2001). A recuperação dessas áreas é também motivo de grandes esforços por parte dos órgãos governamentais, universidades e institutos de pesquisa (Brown & Lugo, 1994).

Dentre as metodologias de recuperação de áreas degradadas, geralmente emprega-se a aplicação da camada superficial de solo fértil, removida e armazenada antes do início da atividade de mineração, e solo oriundo de áreas de empréstimo, para a recomposição da topografia da área, afim de que a área anteriormente minerada volte a ter condições favoráveis ao desenvolvimento das plantas e microrganismos. Essas camadas de solo, geralmente ricas em matéria

orgânica, nutrientes, microrganismos, macrofauna e sementes, contribuirão para o processo de reabilitação, acelerando a revegetação que pode ser espontânea ou induzida pelo homem, através da sementeira de plantas herbáceas e plantios de mudas de árvores nativas ou exóticas. O grau de sucesso da reabilitação de áreas mineradas é extremamente variável em função das condições físicas, químicas e biológicas do local e das técnicas adotadas. A revegetação é a principal prática para recompor e proteger o solo, evitar a poluição das águas (Siqueira, et al., 1994) e promover o retorno da vida selvagem (Griffith, 1980) reconstituindo e acelerando assim, os processos da sucessão natural (Lorenzo, 1991). Por isto esta tem sido empregada como indicadora da reabilitação de áreas (Brower & Zarg, 1977).

Parâmetros microbiológicos e bioquímicos foram estudados como indicadores do grau de reabilitação de áreas degradadas pela mineração de bauxita. A mineração reduziu a ocorrência, diversidade e eficiência de microrganismos diazotróficos (simbióticos e associativos) e fungos micorrízicos arbusculares (Melloni, 2001). Motta (2002), demonstrou grande diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. com caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) isoladas das mesmas áreas. Os parâmetros bioquímicos avaliados: biomassa carbono e nitrogênio, respiração basal,  $qCO_2$ , carbono orgânico, nitrogênio total, urease,  $\beta$ -glicosidase, fosfatase ácida e hidrólise do diacetato de fluoresceína também foram afetados negativamente pela mineração, sendo sensíveis às modificações do solo (Carneiro, 2000). Tais modificações foram induzidas por alterações em parâmetros edáficos ocorridas acima e abaixo da superfície, como, por exemplo, a presença e o tipo de vegetação, manejo e técnicas de recuperação do solo (Siqueira et al., 1994).

O conhecimento das condições biológicas do solo em termos de reabilitação é de grande interesse no contexto eco-funcional de áreas degradadas pela mineração (Siqueira et al., 1994), pois, a diversidade e atividade microbiana

do solo são consideradas fatores importantes na sustentabilidade dos ecossistemas. A redução da comunidade microbiana, com eventual extinção de espécies de microrganismos, pode causar a perda de importantes funções do solo, redução da habilidade dos sistemas naturais de superar os estresses e ainda a perda de estirpes inoculantes potenciais.

O presente estudo se torna importante, pois, não há trabalhos na literatura sobre caracterização de bactérias diazotróficas associativas isoladas de áreas de mineração de bauxita.

## **2.2 Taxonomia, ocorrência e contribuição das bactérias diazotróficas associativas**

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. Todavia, quando 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, e ainda com a descoberta do gênero *Azospirillum* por Döbereiner & Day (1975), foi que pesquisadores começaram a se interessar pela associação de bactérias diazotróficas em não leguminosas (Baldani et al., 1999).

A contribuição da fixação biológica de  $N_2$  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 (Balota et al., 1997). Estas associações podem ser importantes nos sistemas de



agricultura sustentável no Brasil (Baldani et al., 1996 a) e em sistemas perturbados que se encontram em estádios de reabilitação, uma vez que o nitrogênio é um nutriente escasso nesses ecossistemas (Silva, 1994).

### 2.2.1 Gênero *Azospirillum*

Dentre os microrganismos diazotróficos, os do gênero *Azospirillum*, definido por Tarrand et al. (1978), são constituídos de microrganismos procariotos situados no domínio Bacteria, denominados por alguns autores Eubacteria (bactérias verdadeiras), mas precisamente situados na subdivisão  $\alpha$ -Proteobacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirilo. Atualmente, compreende sete espécies caracterizadas com base na análise fenotípica, DNA:DNA e seqüência da 16s do 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), *A. largomobile* (Dekhil et al., 1997) e *A. doebereineriae* (Eckert, et al., 2001). O seqüenciamento da 16s do rRNA mostrou a formação de dois subgrupos distintos de bactérias diazotróficas associativas do gênero *Azospirillum*. O primeiro é formado pelas espécies: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. largomobile* e *A. doebereineriae*, apresentando as duas primeiras espécies alto grau de similaridade genética. O segundo subgrupo é formado pelas espécies *A. amazonense* e *A. irakense*. Contudo, tal subgrupo permanece fazendo parte do gênero *Azospirillum* pois, não apresentou características genéticas divergentes que justificasse a criação de um novo gênero para agrupá-lo (Dekhill et al., 1997).

O ativo metabolismo desse gênero muda de acordo com a composição nutricional do meio e com o estádio de desenvolvimento da célula, sendo esse muito afetado por condições de estresse (Bashan, 1991). Dessa forma, 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 proliferam-se em condições aeróbicas, mas são preferencialmente microaerófilos na presença ou ausência de N<sub>2</sub> no meio, apresentando comportamento ativo, muito móveis no meio de cultivo. *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. doebereineriae* 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 (Lange & Moreira, 2002; Magalhães & Döbereiner, 1984), apresentando uma distribuição ecológica ampla (Döbereiner & Pedrosa, 1987) e por isso, têm sido consideradas bactérias universais (Bashan & Holguin, 1997). 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., 1979; Magalhães, et al., 1984; Baldani, 1997). A espécie *A. irakense* tem sido isolada de raízes de arroz na região subtropical do Iraque (Khammas et. al., 1989). As espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* são as mais frequentemente encontradas colonizando a

maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas (Nosco et al., 1994). *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 mais nova espécie de *Azospirillum*, denominada *A. doebereineriae* foi isolada de raízes da gramínea do gênero *Miscanthus*, cultivada na Alemanha (Eckert et al.; 2001).

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- $\beta$ -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 vibrio, 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 vibrio com um concomitante crescimento da população. Aparentemente, a forma cística é a resposta da bactéria ao estresse hídrico na rizosfera.

*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 nitritos; 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 (Boddley et al., 1983; Riggs et al., 2001), possibilitando o aumento da disponibilidade desse íon no sistema radicular (Christiansen-Weniger & Vanderleyden, 1994). Dessa forma, segundo Bashan (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 a 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., 1991). 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 (Boddley & Döbereiner, 1988; Bashan & Holguin, 1997).

### 2.2.2 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* é composto de três espécies: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986), *H. rubrisulbalbicans* (Baldani et al., 1996), *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001). 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 sequencial 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  $\beta$ -Proteobacteria, junto com *Orolobacter formigenes* como demonstrado por Sievers et al. (1998). As células deste gênero são gram-negativas contendo grânulos de poli- $\beta$ -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* sp. nov. (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, 1999) 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). Devido a isto, 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. *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* e *seropedicae* e outras bactérias endofíticas dentre elas: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia* sp. foram isolados de cana de açúcar em crescimento (Urquiaga et al., 1992, Baldani et al., 1997, Yoneyama et al., 1997 e 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 (Boddley, 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 (Bastian et al., 1998), a qual não é tão efetiva em relação à espécie *Azospirillum brasilense* (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).

### 2.2.3 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* situa-se na subdivisão  $\beta$ -Proteobacteria. As células são gram-negativas, em forma de bastonetes móveis com três a vários flagelos e são geralmente encapsuladas, acumulando poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) como material de reserva, especialmente quando crescidas em meio deficiente em nitrogênio (Baldani, 1996). Em 1992, Yabuuchi e colaboradores propuseram, com base na composição celular, seqüenciamento da 16s do rRNA, homologia do DNA:DNA e características fenotípicas, a transferência de seis espécies de *Pseudomonas* (*P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. mallei*, *P. pickettii* e *P. solanacearum*) para o gênero *Burkholderia*, que é atualmente representado por 28 espécies bacterianas (\*<http://www.dsmz.de/bactnom/nam4571.html>). Tal gênero é composto de representantes muito versáteis, sendo encontrados nos mais variados habitats terrestres, metabolizando diversos compostos, fixando nitrogênio (Gillis et al., 1995; Baldani, 1996), além de representar um "pool" de material genético que pode ser transmitido a outros microrganismos que estão filogeneticamente distantes (Boronin, 1992 citado por Baldani, (1996); Minerdi et al., 2001).

Bactérias microaerófilas, como as do gênero *Burkholderia*, têm sido isoladas de tecidos de gramíneas (Baldani, 1996), mandioca (Balota et al., 1996), fruteiras (Weber et al., 2000; Weber et al., 2001), milho (Dicello et al., 1997),

---

\*Consultado em agosto de 2002.

café (Santos, et al., 2001), cana-de-açúcar e arroz (Baldani et al., 1995). 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. Há relatos recentes demonstrando a capacidade de alguns isolados de *Burkholderia nodular* leguminosas. Estes isolados foram identificados através do seqüenciamento da região 16s rRNA e apresentaram: 96,9% de similaridade com a espécie *B. kururiensis*, 96,8% com a espécie *B. brasilensis* e 96,8% com a espécie *B. graminis* (Moulin et al., 2001). Também representantes do gênero foram isolados em nódulos de diversas espécies de leguminosas florestais na Amazônia (\*Moreira, comunicação pessoal).

Assim como para o gênero *Azospirillum*, tem-se verificado a produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas também para o gênero *Burkholderia* (Balota et al., 1994; Bevivino et al., 1994; Malik et al., 1997). Segundo Baldani et al., (2000) a inoculação de bactérias do gênero *Burkholderia* propicia melhor crescimento de mudas micropropagadas de bananeiras e arroz. De acordo com Bevivino et al. (1994), isolados de *Burkholderia cepacia* são capazes de reduzir o crescimento do fungo fitopatogênico ao milho *Fusarium moniliforme* tanto em meio de cultura quanto em ensaios em casa de vegetação (Bevivino et al., 2000). Com a utilização de técnicas de genética molecular foi possível demonstrar que representantes do gênero *Burkholderia* podem ser encontrados, em simbiose intracelular (endossimbiose) com o fungo micorrízico *Gigaspora margarita*, no solo. Foi evidenciado que o fungo continha em seu material genético o gene Nif da bactéria, o qual se expressava durante a germinação dos esporos. O interesse em tal descoberta foi a evidência de que, fungos micorrízicos, potencialmente, podem ser capazes de fixar nitrogênio, quando em simbiose com *Burkholderia* (Minerdi et al., 2001). Além de estabelecer simbiose e associação com algumas espécies vegetais, o gênero também possui representantes que são patógenos humanos. Um exemplo é a

---

\*Dr<sup>a</sup>. Moreira, F.M.S. Universidade Federal de Lavras-MG, 2002.



espécie *B. cepacia*, que além de ser uma bactéria rizopromotora de crescimento para a cultura do milho (Bevivino et al., 2000), contém isolados considerados patógenos oportunistas de infecções em seres humanos, apresentando-se altamente resistente aos antibióticos (\*<http://www.itqb.unl.pt/spbt/publica/bbnet/julho60/bbiotecn.htm>.) (Fiore et al., 2001).

Por desempenharem funções extremamente importantes, os microrganismos diazotróficos são considerados grupos funcionais chaves no sistema solo-planta. Pode-se constatar, portanto, que são fundamentais nas transformações que sustentam e equilibram ecossistemas naturais (Moreira & Siqueira, 2002). Estudos sobre sua ocorrência e caracterização tornam-se importantes, tanto para ampliar o conhecimento sobre sua biodiversidade, quanto para isolamento de estirpes promissoras para usos potenciais diversos.

### **2.3 Características morfológicas e fenotípicas para estudo de diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas**

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar que, grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (Moreira & Siqueira, 2002).

O descobrimento das espécies de bactérias diazotróficas endofíticas se deve, principalmente, à introdução do meio semi-sólido NFB e posteriormente a outros meios derivados deste (JNFB, FAM, LGIP e JMV) sem N na forma combinada, onde essas bactérias, devido à sua característica de aerotaxia, se deslocam para a região do meio de cultura onde a taxa de difusão de O<sub>2</sub> está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias (Döbereiner et al., 1995). O

\* Consultado em agosto de 2002.

isolamento destes microrganismos em meio de cultura é utilizado para estudos preliminares, visando uma caracterização fenotípica parcial. São considerados os requerimentos nutricionais específicos do microrganismo alvo, assim como seu tipo de metabolismo, afim de compará-los com as das espécies descritas, visando a construção de uma chave de identificação. Para o grupo das bactérias diazotróficas pertencentes principalmente aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, as principais características utilizadas para auxiliar na caracterização fenotípica cultural, morfológica e fisiológica dos representantes destes gêneros são apresentadas na tabela 1 e 2.

Não é possível a caracterização de bactérias com base apenas em caracteres anatomorfológicos. Desse modo, a revelação do perfil eletroforético de proteínas totais para identificação de espécies bacterianas tem fornecido informações adicionais nos estudos de caracterização e taxonomia, pois, se considerarmos que a maior expressão do genoma microbiano resulta da síntese de aproximadamente 2000 moléculas de proteínas, a revelação dessa informação, representa um imenso potencial para a caracterização dos microrganismos (Jackman, 1985). Resultados expressivos de pesquisas demonstraram haver correlação entre a análise de hibridização DNA-DNA e do perfil eletroforético de proteínas (Vandamme et al., 1990; Kampfer, 1995; Vandamme et al., 1997).

Dentre as várias técnicas para caracterização de proteínas (Hames & Reckwold, 1990; Alfenas et al., 1991; Patel, 1994), a técnica do fracionamento de proteínas desnaturadas em géis verticais de SDS-PAGE é a preferível, dada a rapidez, alta resolução e facilidade de uso. O objetivo do método é a separação de proteínas presentes em misturas complexas. Inicialmente, a amostra é desnaturada por aquecimento, na presença de um detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol).

TABELA 1 Resumo de algumas características referenciadas para diferenciar as espécies de bactérias diazotróficas associativas do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

CARACTERÍSTICAS	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	<i>H. frisingense</i>	<i>B. brasilensis</i>
Largura da célula (µm)	0,6-0,7	0,6-0,7	0,5-0,7	1,5-1,6
Forma da célula	víbrio	espirilo	espirilo	bastão
Meio de cultura p/ isolamento	JNFb	JNFb	JNFb	JMV
Fontes de carbono				
- Sacarose	-	-	nd.	+
- Manitol	+	+	+	+
- Glicose	+	+	nd.	+
NaCl (%)	nd.	nd.	nd.	1
Faixa de pH para crescimento	5,3-8,0	5,3-8,0	6,0-7,0	4,0-7,0

Adaptado de Baldani et al. (1986); Baldani et al. (1996); Kirchof et al. (2001); Baldani, (1996).

TABELA 2 Resumo de algumas características referenciadas para diferenciar as espécies de bactérias diazotróficas associativas do gênero *Azospirillum*.

CARACTERÍSTICAS	<i>A.f</i> <sup>(1)</sup>	<i>A.b</i> <sup>(2)</sup>	<i>A.d</i> <sup>(3)</sup>	<i>A.h</i> <sup>(4)</sup>	<i>A.i</i> <sup>(5)</sup>	<i>A.f</i> <sup>(6)</sup>	<i>A.d</i> <sup>(7)</sup>
Largura da célula (µm)	1,0-1,7	1,0-1,2	0,8-1,0	0,7-1,4	0,6-0,9	0,7-1,5	1,0-1,5
Forma da célula	víbrio	víbrio	víbrio	víbrio	víbrio	víbrio	víbrio
Meio p/ isolamento	NFb	NFb	FAm	NFb	NFb	nd.	NFb/ JNFb
Fontes de carbono							
- Sacarose	-	-	+	-	+	nd	-
- Manitol	+	-	-	+	-	+	+
- Glicose	+	-	-	-	-	+	+
3 % NaCl	-/+	-	-	+	+	+	nd.
Polimorfismo celular	+	-	-	+	+	+	+
Faixa de pH para crescimento	5,7-6,8	6,0-7,8	5,7-6,5	6,8-8,0	5,5-8,5	nd	6,0-7,0

<sup>(1)</sup>*Azospirillum lipoferum*. <sup>(2)</sup>*Azospirillum brasilense*. <sup>(3)</sup>*Azospirillum amazonense*.

<sup>(4)</sup>*Azospirillum halopraeferens*. <sup>(5)</sup>*Azospirillum irakense*. <sup>(6)</sup>*Azospirillum largimobile*.

<sup>(7)</sup>*Azospirillum doebereineriae*. Adaptado de Tarrand et al. (1978); Magalhães et al. (1983); Reinhold et al. (1987); Khammas et al. (1989); Dekhill et al. (1997); Eckert et al. (2001).

O SDS é usado para envolver as moléculas protéicas enriquecendo-as com cargas negativas, em proporção ao comprimento da molécula, visto que a carga negativa induzida pelo SDS é de grande magnitude, a separação primária ocorre com base no peso molecular. A elevada resolução das bandas reveladas é obtida pelo uso de um sistema descontínuo de géis, o qual possui uma camada de gel de concentração e outra para a separação das bandas (gel de corrida). Esses dois géis podem diferir na concentração de sais, pH, concentração de acrilamida ou combinação desses fatores (Alfenas & Brune, 1998). Esta técnica está entre as que permitem uma melhor resolução de bandas. Possibilita avaliação ao nível quantitativo da diferença de concentração de polipeptídeos existentes na amostra e ao nível qualitativo, pois, permite avaliar a presença ou ausência de proteínas (Carraro, 1990). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totais produz padrões de bandas que podem ser consideradas “impressões digitais” específicas dentro de diferentes Taxa de bactérias. Este método diferencia níveis de espécie e subespécie (Rademaker & Bruijnm 1997) (Figura 1), visto que a estabilidade do padrão eletroforético permite a comparação dos perfis, fornecendo uma medida segura da relação taxonômica das amostras analisadas. É considerada uma ferramenta útil para o estudo da diversidade de microrganismos em geral (Chen et al. 2001; Kampfer et al., 1995) e tem sido aplicada no estudo de diazotróficos simbióticos (Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Lajudie et al., 1998a; Lajudie et al., 1998b) e também no gênero *Burkholderia* (Santos et al., 2001). No entanto, tem sido pouco utilizada na caracterização de bactérias associativas dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

Família	Gênero	Espécie	Subespécie	Estirpe
Seqüenciamento do DNA				
Seqüenciamento 16SrDNA				
ARDRA				
Reassociação DNA-DNA				
tRNA-PCR				
ITS-PCR				
RFLP LFRFA PFGE				
Isozima multilocus				
SDS-PAGE				
AFLP				
RAPD's APPCR				
Rep-PCR				

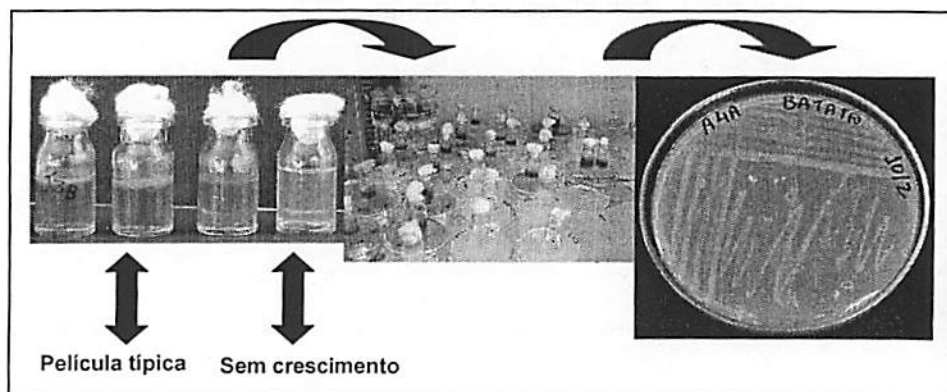
FIGURA 1 Resolução relativa de vários fingerprints e técnicas de DNA (modificado de Rademaker & Bruijn, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estirpes de bactérias diazotróficas

Os 72 isolados de bactérias diazotróficas estudados foram oriundos de amostras de solo de cambissolo distrófico em áreas da ALCOA Alumínio S/A, localizadas em Poços de Caldas, de 10 locais, conforme descrito na tabela 3. Os atributos químicos e físicos das amostras de solos coletadas foram avaliados por Meloni, (2000). Esses isolados foram obtidos em meios de cultura específicos (Anexo 1A) JNFb (*Herbaspirillum* spp.), NFB (*Azospirillum* spp.) e FAM (*Azospirillum amazonense*) e mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$ . As características culturais desses isolados em meio de cultivo batata (Anexo 1A) (figura 2), estão descritas na tabela 4. Para comparação foram utilizadas 7 estirpes-tipo, para o presente estudo: BR9004 (*Burkholderia* sp. isolada de nódulo de leguminosa arbórea), BR11080<sup>T</sup> (*Azospirillum lipoferum*), BR11340<sup>T</sup> (*Burkholderia brasilensis*), *Azospirillum irakense*, BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasilense*) e BR11040<sup>T</sup> (*Azospirillum amazonense*). As estirpes-tipo de *Burkholderia* foram incluídas como referência pois, foi relatado seu isolamento em meios similares aos utilizados neste estudo (Baldani, 1996).

Figura 2 Esquema resumido de isolamento das bactérias diazotróficas.



\*Dr<sup>a</sup>. Moreira, F.M.S. Universidade Federal de Lavras-MG, 2002.

TABELA 3 Origem das estirpes de bactérias diazotróficas.

Área de Origem em Poços de Caldas	Isolados
<b>CAMPO</b>	
Recém-minerado, coberto por braquiária ( <i>Brachiaria decumbens</i> ) e feijão-guandu ( <i>Cajanus cajan</i> )	UFLA1, UFLA 2, UFLA 3, UFLA28, UFLA29, UFLA30, UFLA62 UFLA66 UFLA67 UFLA69
Capim-azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) e <i>Eupatorium</i> sp. (Asteraceae)	UFLA59, UFLA63, UFLA64
Capim-gordura ( <i>Melinis minutiflora</i> ), em sucessão. Presença de espécies nativas como bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> )	UFLA6, UFLA32, UFLA33, UFLA34, UFLA35, UFLA60, UFLA61
Bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> ) e sub-bosque bem desenvolvido (capim-gordura, alecrim)	UFLA1, UFLA7, UFLA8, UFLA9, UFLA36, UFLA54, UFLA55, UFLA56, UFLA57, UFLA58, UFLA65, UFLA68, UFLA70
Referência com espécies graminóides e arbustivas (sem alteração antrópica)	UFLA4, UFLA5, UFLA31
<b>SERRA</b>	
Recém-minerado. Coberto por capim gordura, feijão guandu e espécies arbóreas nativas	UFLA25, UFLA26, UFLA27, UFLA48, UFLA49, UFLA50
Braquiária, feijão guandu e espécies arbóreas nativas	UFLA20, UFLA21, UFLA22, UFLA23, UFLA24, UFLA44, UFLA45, UFLA46, UFLA47, UFLA71, UFLA72
Espécies arbóreas nativas, sub-bosque desenvolvido, serapilheira adicionada	UFLA11, UFLA12, UFLA13, UFLA14, UFLA15
Bracatinga e vegetação rasteira e arbustiva, processo de sucessão lento	UFLA16, UFLA17, UFLA18, UFLA19, UFLA39, UFLA40, UFLA41, UFLA42, UFLA43, UFLA51, UFLA52, UFLA53
Bracatinga e sub-bosque coberto por capim gordura	UFLA37, UFLA38

TABELA 4 Descrição das características culturais dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e estirpes-tipo, obtidos de amostras de solo coletadas, após mineração de bauxita em meio de cultivo batata sólido (Melloni et al., submetido 2002).

Grupos fenotípicos culturais	Descrição <sup>#</sup>	Isolados (Prefixo UFLA) e estirpes-tipo
I	1-1-1	1, 52
II	1-1-2	<i>B. brasilensis</i> BR11340 <sup>T</sup> , 2, 63, 64, 65, 66, 70
III	2-1-2	5, 12, 28, 34, 69
IV	2-1-1	18, 42, 47, 24
V	1-2-1	<i>H. seropedicae</i> BR 11175 <sup>T</sup>
VI	3-2-2	3, 4, 6, 8, 19, 26, 31, 41
VII	2-2-2-	7, 10, 13, 16, 30, 53
VIII	2-2-1	14
IX	3-2-1	<i>A. irakense</i> <sup>T</sup> , 36
X	3-1-1	17
XI	4-1-2	23, 48
XII	2-1-3	38
XIII	3-1-3	44, 45, 51
XIV	4-2-2	9
XV	4-3-2	21
XVI	4-2-1	71
XVII	4-4-1	29
XVIII	4-4-2	35, 46
XXIX	3-4-2	15
XX	3-4-3	20
XXI	4-4-3	39, 40, 49
XXII	3-3-3	43
XXIII	2-3-2	11
XXIV	1-3-2	56
XXV	2-4-3	22, 37, 72
XXVI	2-3-3	<i>A. brasilense</i> BR11101 <sup>T</sup>
XXVII	4-5-2	25
XXVIII	4-6-2	27
XXIX	4-6-1	32, 33
XXX	4-6-3	50
XXXI	3-6-3	<i>A. amazonense</i> BR11140 <sup>T</sup> , 61
XXXII	1-6-2	54, 55, 58, 60, 67, 68
XXXIII	1-6-1	57
XXXIV	1-5-2	59
XXXV	1-6-3	62
XXXVI	2-6-3	<i>A. lipoferum</i> BR11080 <sup>T</sup>

<sup>#</sup> 1º valor diâmetro médio da colônia que varia de 1) < 1mm; 2) 1-2mm; 3) 2-3mm; 4) >3mm. 2º valor cor da colônia: 1) creme; 2) creme centro escuro; 3) creme claro; 4) rosa; 5) creme transparente; 6) branco. 3º valor consistência da colônia 1) consistente; 2) mole; 3) dura/quebradiça.



### **3.2 Caracterização em meio de cultivo GNA e teste gram**

Para a caracterização cultural em meio de cultura GNA (caldo nutritivo, 20g L<sup>-1</sup>, glicose, 5g L<sup>-1</sup>, ágar 15g L<sup>-1</sup> e pH 6,8), as estirpes e isolados foram crescidos durante 5 dias à temperatura de 27°C, sendo avaliadas as seguintes características culturais: dias de aparecimento das colônias, diâmetro médio das colônias (mm), produção de goma (muita ou pouca), coloração das colônias (branca, rosa, rosa claro, creme, creme escuro, creme com centro escuro), consistência das colônias (mole, consistente, dura), formato de bordo (circular, irregular, puntiforme elevado, convexo, plano) e margem do bordo (inteiro, ondeado, irregular). Para facilitar o agrupamento da caracterização morfológica das bactérias, uma matriz binária dos dados originais (31 X 79) foi construída, compreendendo as características morfológicas e suas variações e os setenta e dois isolados e sete estirpes estudados. Para cada característica foram atribuídos valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência da mesma. A caracterização morfológica de cada bactéria foi comparada e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jacard ( $S_j$ ), cuja equação é  $S_j = a/a + b + c$ , e o agrupamento destas foi pelo método UPGMA (average linkage clustering) sendo que o princípio deste, baseia-se na distância intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.0t). Para o teste de gram os isolados foram crescidos durante 5 dias no meio de cultivo GNA sólido. Retirou-se com uma alça de platina uma porção das culturas para a execução, segundo o método de Bartholowew (Yano et al., 1993).

### **3.3 Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultura batata modificado**

Estirpes e isolados de bactérias foram estudados quanto à tolerância a diferentes concentrações de cloreto de sódio em meio batata sólido (Döbereiner et al., 1995) modificado. As estirpes e os isolados foram inoculados em 50 mL

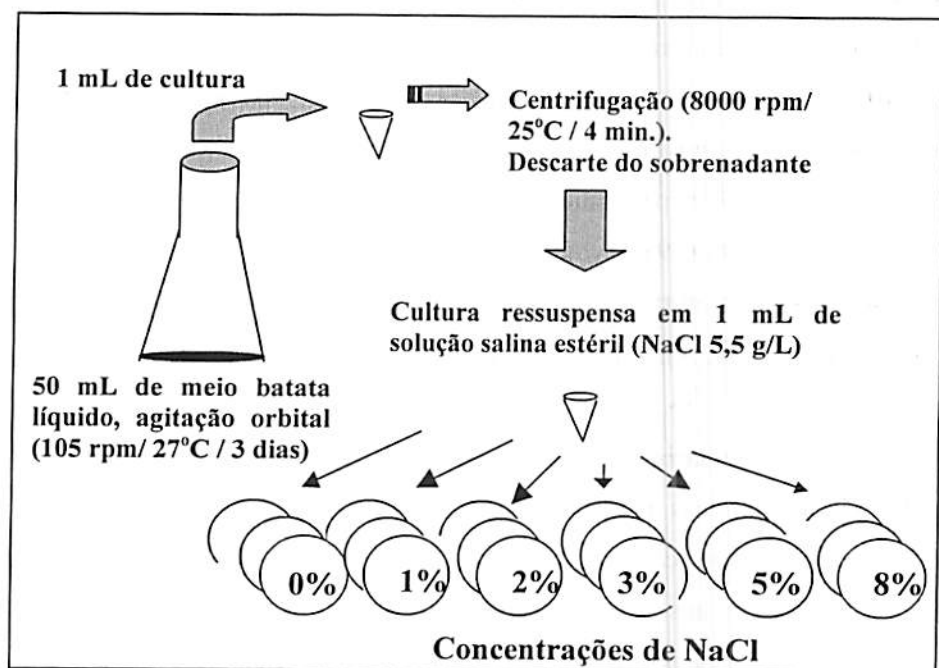
de meio batata líquido e mantidos sob agitação orbital à 105 rpm, 27°C. Após o crescimento por 3 dias para todos os microrganismos, sendo este o tempo necessário para que atingissem a fase log, uma alíquota de 1 mL de cultura de cada estirpe e isolado foi transferida para tubos eppendorf de 1,5 mL esterilizados, e centrifugada à 8.000 rpm, à 25°C, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 5,5 g L<sup>-1</sup>) e centrifugadas novamente, repetindo-se o processo de lavagem das células por 3 vezes. Este processo de lavagem foi realizado visando a remoção de resíduos do meio de cultura do inóculo, que poderiam resultar num falso positivo de crescimento, quando as bactérias fossem inoculadas nos meios de cultura, contendo as diferentes concentrações de NaCl. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL dessas suspensões de bactérias foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas que continham meio batata modificado por adição de soluções salinas de NaCl nas seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30, 50 e 80 g L<sup>-1</sup> (Figura 3). As placas foram incubadas a 27°C por 7 dias para todos os isolados e estirpes. Os tratamentos foram distribuídos inteiramente ao caso, com três repetições. Para avaliar o tolerância das bactérias ao cloreto de sódio, foi observada a presença ou ausência de crescimento no meio de cultura.

### **3.4 Avaliação da forma das células em microscópio ótico**

As estirpes-tipo e os 72 isolados de bactérias diazotróficas foram crescidos no meio de cultivo batata semi-sólido (Döbereiner et al., 1995) durante 3 dias à temperatura de 27°C. Depois foi retirada uma alíquota de cada tubo para montagem das lâminas e observação em contraste de fase no microscópio Olympus Dx40. As características observadas foram: movimento celular (rápido, lento, circular e trajetória), forma da célula (vibrio, bastão e espirilos), formação de cadeias bacterianas (presença e ausência), presença de grânulos de poli-β-

hidroxibutirato. A largura celular de cada isolado foi aferida através de uma média de largura de cinco bactérias.

Figura 3 Esquema das etapas executadas para a instalação do experimento de tolerância à salinidade



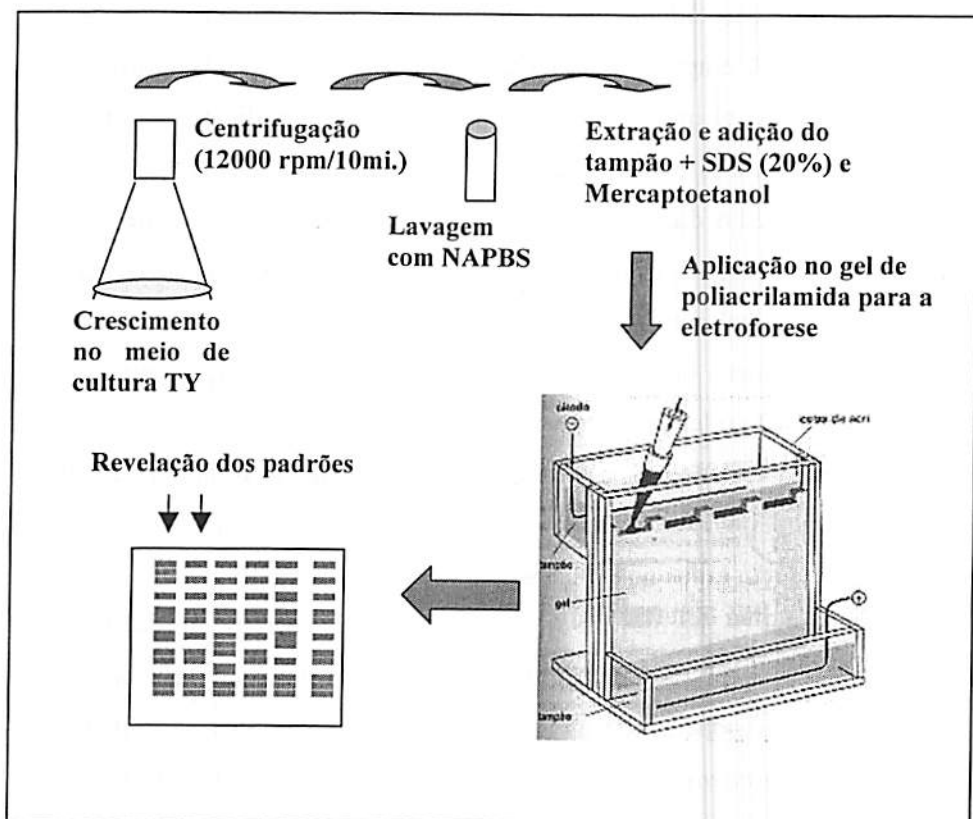
### 3.5 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As estirpes e isolados em estudo foram cultivados no meio de cultura sólido GNA. Após o crescimento em placa, inocularam-se os mesmos em 50 mL de meio de cultura líquido TY (Anexo 2A). O crescimento se deu sob agitação constante de 120 rpm por 4 dias à temperatura de 28°C. Após, o meio de crescimento com as bactérias foi centrifugado à 12000 rpm por 10 min. à temperatura 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao “pelet”

formado foi adicionado o tampão NaPBS (Anexo 2A) e novamente centrifugado repetindo-se este processo por duas vezes, para lavagem das células. Foi pesado 70 mg de células de cada isolado em tubo Eppendorf e, em seguida, adicionou-se 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) (Anexo 2A) e 0,1 mL de SDS a 20% para solubilização das proteínas. Em seguida, aqueceu-se a mistura em banho maria à 95°C por 10 min. Depois, as amostras foram centrifugadas à 12000 rpm por 10 min., à temperatura de 4°C. Coletou-se o sobrenadante em dois tubos eppendorf, os quais foram armazenados à -20°C para uso imediato. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985). Para eletroforese, utilizou-se um gel de sistema descontínuo com concentração 12% para o gel separador e 5% para o gel de concentração (Anexo 2A). Foram, inoculadas ao gel, 30 µL de cada amostra (Figura 4).

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 13 cadeias polipeptídicas (bandas) representativas dos setenta e nove perfis gerados. Para cada posição de migração foram atribuídos valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de uma banda. Os padrões de migração gerados foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jacard ( $S_j$ ), cuja equação é  $S_j = a/a + b + c$ . Os isolados e estirpes foram agrupados pelo método UPGMA (average linkage clustering), sendo que, o princípio deste, baseia-se na distância intergrupo que é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 1.8 Slice, et al. 1994). Os grupos formados foram comparados com estirpes tipo de *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*.

Figura 4 Esquema resumido das etapas executadas para extração da proteína total de bactérias pelo método SDS-PAGE.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização em meio de cultivo GNA e teste gram

A caracterização cultural dos 72 isolados de bactérias diazotróficas no meio de cultura GNA é apresentada na tabela 5. Pela avaliação da morfologia das colônias foi possível observar diferenças fenotípicas significativas entre os isolados. O tempo em dias para aparecimento das primeiras colônias variou de 1 até 5, o diâmetro médio das colônias < 1 até 4,5 mm e a produção de goma (muita ou pouca). A coloração das colônias variou de branca, rosa, rosa claro, creme, creme escuro até creme com centro escuro; a consistência das colônias (mole, consistente, dura). O formato de bordo variou de circular, irregular até puntiforme; a elevação (elevado, convexo, plano) e a margem (inteiro, ondeado, irregular). Todos os isolados apresentaram maior crescimento (diâmetro médio de colônias) neste meio, do que quando crescidos em meio batata (Tabela 4). Na revelação do teste gram todos os isolados apresentaram-se negativos.

Para facilitar o agrupamento dos isolados e estirpes de bactérias diazotróficas com base na caracterização apresentada na tabela 5, construiu-se o dendrograma de similaridade entre os isolados e as estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia brasilensis* e *Burkholderia* sp. (Figura 5). A 81% de similaridade, 12 grupos foram formados. Os isolados UFLA 2, 5, 31, 6, 8 e 30 formaram o grupo A; UFLA 10 e 19 grupo B; UFLA 14, 26 e 18 grupo C; UFLA 62, 64, 66, 67 e 63 grupo D; UFLA 12, 15, 23 e 17 grupo E; UFLA 33 e 34 grupo F; UFLA 21, 27 e 32 grupo G. O grupo H foi formado por UFLA 11, 55, 56, 68 e 70; o grupo I por UFLA 57, 58, 59, 60 e 69; o J pelas espécies tipo BR9004 e BR11340. O L formado por UFLA 29 e 38 foi agrupado com 100% de similaridade. O grupo M por UFLA 37, 39 e 53. Os demais isolados e estirpes formaram 38 grupos isolados, indicando existir uma grande variação

morfológica dos isolados em relação as estirpes tipo, quando cultivados em meio GNA. Na figura 6 pode-se visualizar as principais morfologia de colônias apresentadas pelos isolados.

TABELA 5 Descrição das características morfológicas em meio de cultivo GNA dos 72 isolados de solos reabilitados pós mineração de bauxita e das estirpe tipo.

Isolado	Tempo (1)	Cor	Consistência	Diâmetro (mm) <sup>(2)</sup>	Goma	Forma	Elevação	Bordo	Superfície	Configuração
UFLA1 <sup>a</sup>	1	creme /centro escuro	dura	2,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA2 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	3,0	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA3 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	3,5	pouca	circular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
UFLA4 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA5 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	2,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA6 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA7 <sup>a</sup>	1	rosa claro	mole	2,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA8 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	3,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA9 <sup>a</sup>	1	rosa claro	consistente	2,5	pouca	circular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
UFLA10 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	3,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA11 <sup>a</sup>	1	branca	consistente	1,0	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA12 <sup>a</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA13 <sup>a</sup>	1	creme/centro escuro	consistente	2,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA14 <sup>a</sup>	1	rosa claro	consistente	2,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA15 <sup>a</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA16 <sup>a</sup>	1	rosa claro	consistente	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA17 <sup>a</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA18 <sup>a</sup>	1	rosa claro	consistente	1,25	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA19 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA20 <sup>a</sup>	1	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	enrugada
UFLA21 <sup>a</sup>	2	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA22 <sup>a</sup>	1	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA23 <sup>a</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA24 <sup>a</sup>	1	branca	consistente	3,5	muita	irregular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
Continua....										



Continua....										
UFLA25 <sup>a</sup>	2	rosa claro	dura	4,0	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA26 <sup>a</sup>	1	rosa claro	consistente	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA27 <sup>a</sup>	2	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA28 <sup>b</sup>	1	rosa claro	dura	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA29 <sup>b</sup>	2	rosa	dura	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA30 <sup>b</sup>	1	rosa claro	dura	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA31 <sup>b</sup>	1	rosa claro	dura	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA32 <sup>b</sup>	2	rosa claro	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA33 <sup>b</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA34 <sup>b</sup>	1	rosa claro	mole	2,0	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA35 <sup>b</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA36 <sup>b</sup>	1	creme escuro	consistente	3,5	pouca	circular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
UFLA37 <sup>b</sup>	2	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA38 <sup>b</sup>	2	rosa	dura	2,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA39 <sup>b</sup>	2	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA40 <sup>b</sup>	2	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA41 <sup>b</sup>	1	rosa claro	mole	3,5	muita	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA42 <sup>b</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA43 <sup>b</sup>	2	rosa claro	dura	2,0	pouca	irregular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
UFLA44 <sup>b</sup>	2	creme	dura	2,0	pouca	irregular	plana	ondeada	rugosa	concêntrica
UFLA45 <sup>b</sup>	1	rosa	dura	4,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA46 <sup>b</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA47 <sup>b</sup>	1	creme	consistente	4,5	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA48 <sup>b</sup>	2	creme	consistente	4,0	muita	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA49 <sup>c</sup>	2	rosa	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA50 <sup>c</sup>	2	branca	dura	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA51 <sup>c</sup>	2	creme/translúcida	mole	<1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA52 <sup>c</sup>	3	creme	mole	3,5	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA53 <sup>c</sup>	2	rosa	dura	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	concêntrica
UFLA54 <sup>c</sup>	3	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA55 <sup>c</sup>	1	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
Continua....										

Continua....										
UFLA56 <sup>c</sup>	1	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA57 <sup>c</sup>	2	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA58 <sup>c</sup>	2	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA59 <sup>c</sup>	2	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA60 <sup>c</sup>	2	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA61 <sup>c</sup>	5	branca	consistente	<1	pouca	puntiforme	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA62 <sup>c</sup>	5	creme	mole	<1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA63 <sup>c</sup>	3	creme	mole	<1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA64 <sup>c</sup>	4	creme	mole	<1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA65 <sup>c</sup>	1	branca	consistente	<1	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA66 <sup>c</sup>	5	creme	mole	1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA67 <sup>c</sup>	5	creme	mole	<1	pouca	puntiforme	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA68 <sup>c</sup>	1	branca	mole	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA69 <sup>c</sup>	2	branca	consistente	2,0	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA70 <sup>c</sup>	1	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA71 <sup>b</sup>	1	rosa claro	dura	3,5	pouca	circular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
UFLA72 <sup>a</sup>	1	rosa claro	dura	4,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	enrugada
BR 9004	1	creme	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
BR 11340	1	branca	consistente	1,5	pouca	circular	convexa	inteiro	lisa	concêntrica
BR11001	1	rosa claro	dura	3,0	pouca	irregular	plana	ondeada	rugosa	enrugada
BR 11175	2	creme	consistente	2,0	pouca	irregular	plana	inteiro	lisa	concêntrica
BR11040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR11080	2	creme	consistente	1,5	pouca	circular	plana	inteira	lisa	concêntrica
<i>A. irakense</i>	2	rosa	consistente	1,5	pouca	circular	plana	inteiro	rugosa	enrugada

<sup>a</sup> Isolado obtido em meio de cultura semi-sólido JNFB.; <sup>b</sup> Isolado obtido em meio de cultura semi-sólido NFB.; <sup>c</sup> Isolado obtido em meio de cultura semi-sólido FAM. <sup>(1)</sup> Tempo em dias; <sup>(2)</sup> Diâmetro médio das colônias.

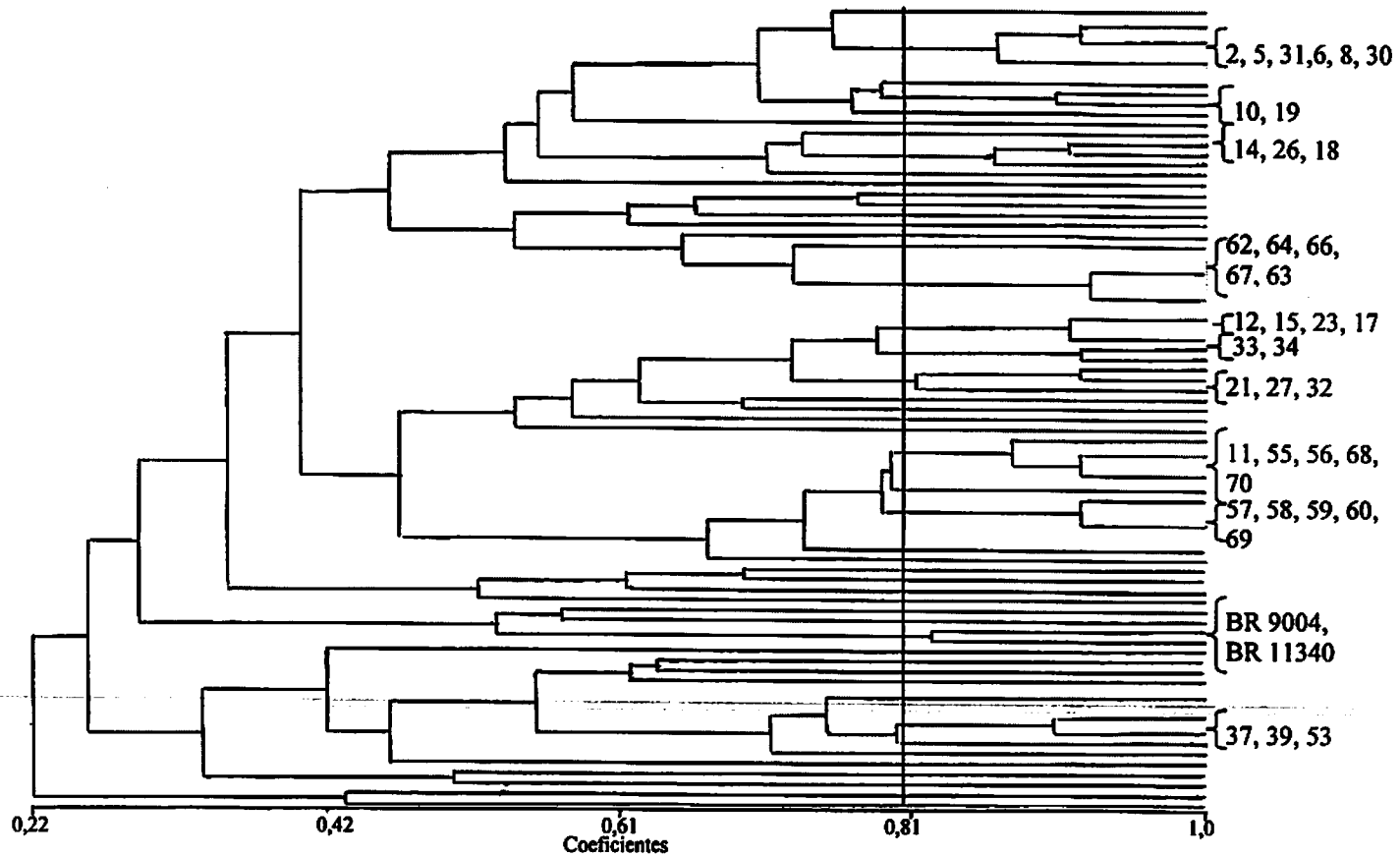


FIGURA 5 Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características morfológicas de bactérias diazotróficas isoladas em amostras de solos de áreas reabilitadas de mineração e as estirpes tipo BR11001<sup>T</sup>, BR11080<sup>T</sup>, BR11040<sup>T</sup>, BR9004, BR11340<sup>T</sup>, BR1175<sup>T</sup>, *Azospirillum irakense*.

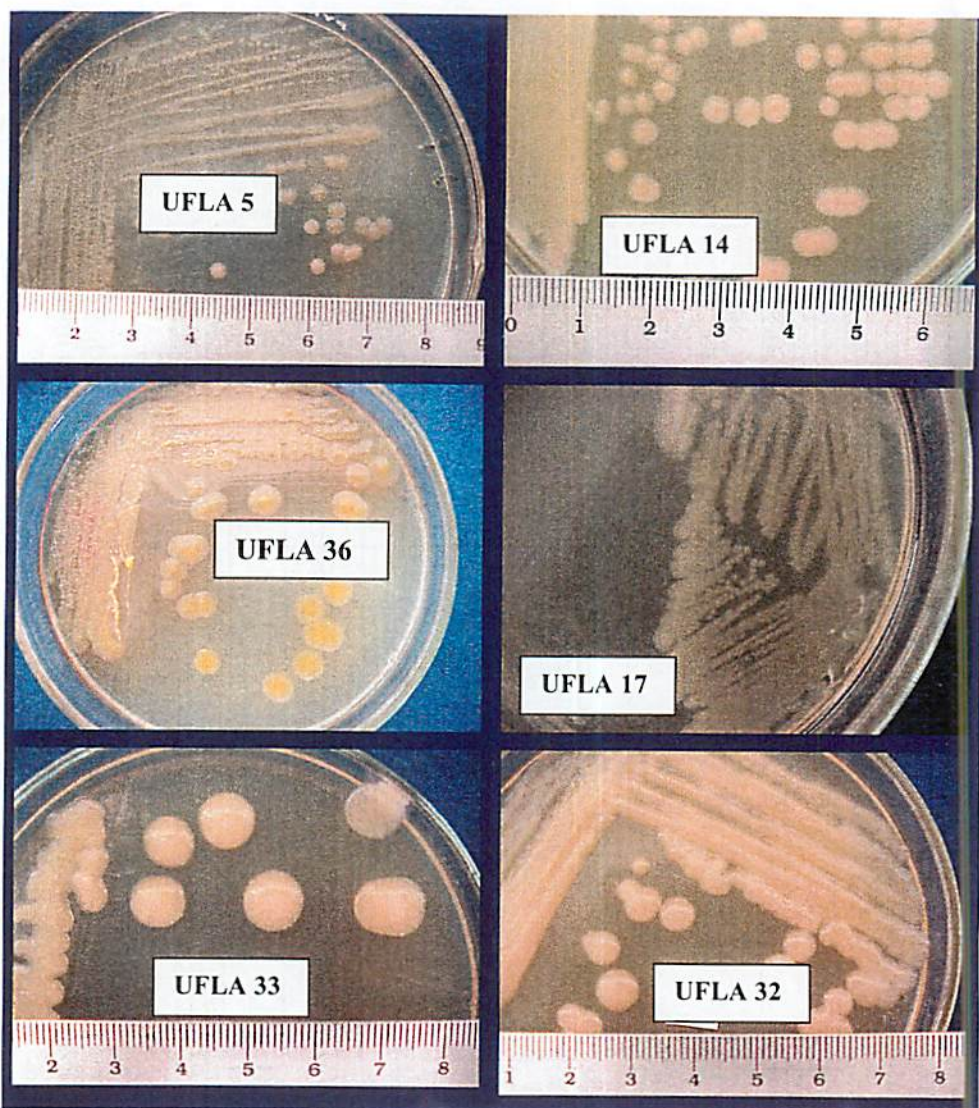


Figura 6 Morfologia de colônias de isolados de bactérias diazotróficas associativas em meio de cultivo GNA. Continua....

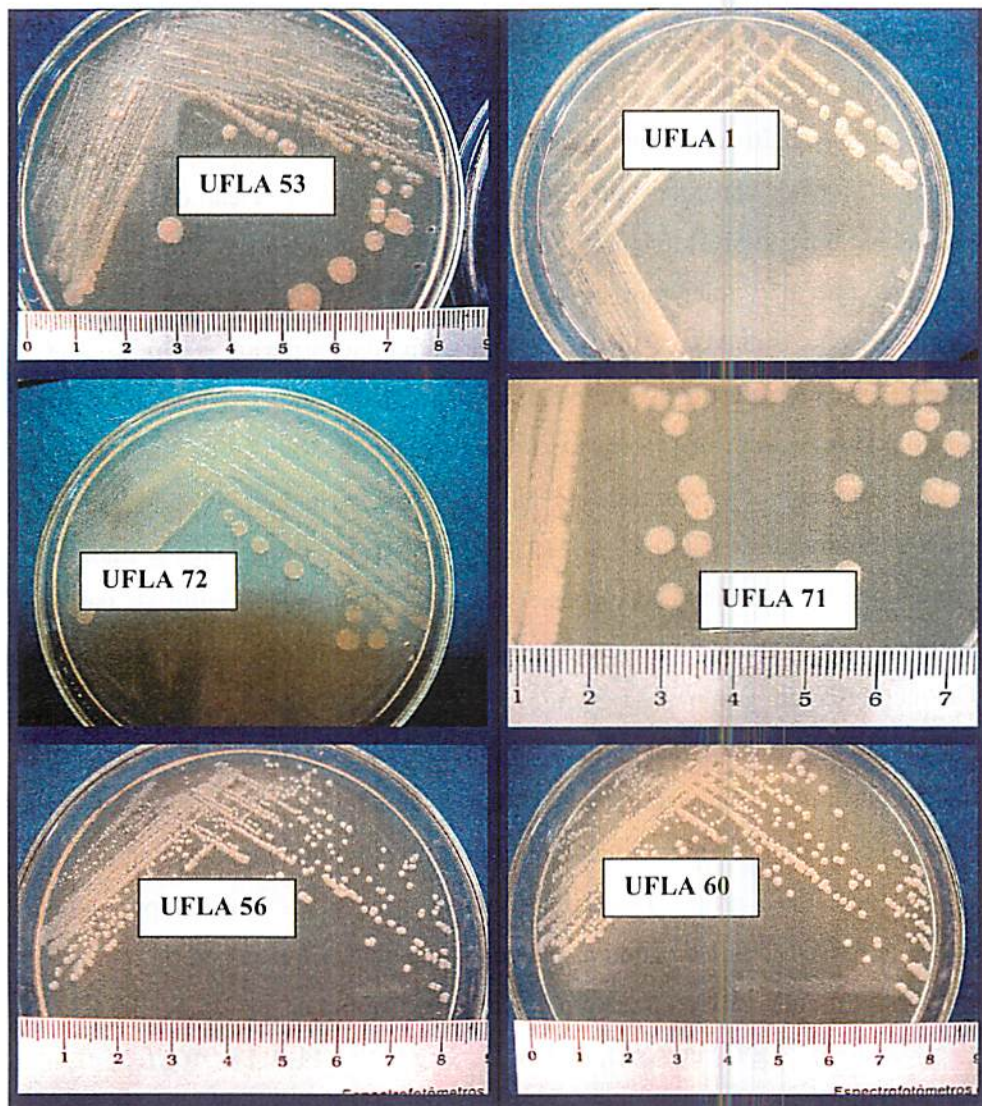


Figura 6 Morfologia de colônias de isolados de bactérias diazotróficas associativas em meio de cultivo GNA.

## **4.2 Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultura batata modificado**

As concentrações máximas toleradas (CMT) por cada isolado de bactéria diazotrófica cultivado em meio batata, suplementado com diferentes concentrações de NaCl, encontram-se na tabela 6. Pela avaliação da tolerância à salinidade foi possível reuni-los em cinco grupos: grupo 1, formado pelos isolados que não toleraram as concentrações de NaCl utilizadas, grupo 2 formado pelos isolados e estirpes que toleraram concentração de 10 g L<sup>-1</sup> NaCl, grupo 3 isolados e estirpes que toleraram concentração de 20 g L<sup>-1</sup> NaCl, grupo 4: isolados e estirpes que toleraram a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de NaCl e grupo 5, que toleraram concentração até 50 g L<sup>-1</sup> NaCl. Nenhum isolado e estirpe cresceu em meio com 80 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Alguns grupos de isolados obtidos pelo agrupamento de similaridade, considerando a caracterização cultural, também apresentaram o mesmo comportamento, quando submetidos ao estresse salino. Os membros do grupo A, UFLA 5, 6, 8, 30 e 31 apresentaram o mesmo comportamento, quando submetidos ao estresse salino com 30 g L<sup>-1</sup> de NaCl no meio de cultura, com exceção de UFLA 2 que tolerou 20 g L<sup>-1</sup>. Todos os isolados do grupo B e C apresentaram o mesmo comportamento tolerando 30 g L<sup>-1</sup> de NaCl. O grupo D também apresentou o mesmo comportamento fisiológico não tolerando nenhuma concentração de NaCl estudada. Já o grupo E apresentou muitas variações quanto à avaliação fisiológica, sendo que UFLA 12 e 15 toleraram 20 g L<sup>-1</sup> de NaCl, UFLA 23, 30 g L<sup>-1</sup> e UFLA 17, 50 g L<sup>-1</sup>.

Todos os isolados dos grupos F, G e L apresentaram o mesmo comportamento, tolerando 20 g L<sup>-1</sup> de NaCl, com exceção do isolado UFLA 27 que não cresceu em nenhum dos tratamentos suplementados com NaCl. Os isolados do grupo H apresentaram variações de tolerância: UFLA 11, 30 g L<sup>-1</sup>; UFLA 55, 56 e 70, 10 g L<sup>-1</sup> e UFLA 68 não tolerou nenhuma concentração de NaCl.

TABELA 6 Concentrações máximas toleradas (CMT) em g L<sup>-1</sup> de NaCl em meio batata modificado, por estirpes e isolados de bactérias diazotróficas.

Isolado/Estirpe	CMT	Isolado/Estirpe	CMT	Isolado/Estirpe	CMT
UFLA27	0	UFLA2	20	BR11080 <sup>I</sup>	20
UFLA50	0	UFLA12	20	BR9004	20
UFLA51	0	UFLA15	20	UFLA8	30
UFLA52	0	UFLA19	20	UFLA9	30
UFLA57	0	UFLA20	20	UFLA10	30
UFLA61	0	UFLA21	20	UFLA11	30
UFLA62	0	UFLA22	20	UFLA13	30
UFLA63	0	UFLA25	20	UFLA14	30
UFLA64	0	UFLA29	20	UFLA16	30
UFLA65	0	UFLA32	20	UFLA18	30
UFLA66	0	UFLA33	20	UFLA23	30
UFLA67	0	UFLA34	20	UFLA24	30
UFLA68	0	UFLA36	20	UFLA26	30
UFLA37	10	UFLA38	20	UFLA28	30
UFLA42	10	UFLA40	20	UFLA30	30
UFLA54	10	UFLA44	20	UFLA31	30
UFLA55	10	UFLA46	20	UFLA35	30
UFLA56	10	UFLA48	20	UFLA39	30
UFLA58	10	UFLA53	20	UFLA41	30
UFLA59	10	UFLA71	20	UFLA43	30
UFLA47	10	UFLA72	20	UFLA45	30
UFLA69	10	UFLA3	30	UFLA47	30
UFLA70	10	UFLA4	30	UFLA49	30
BR11040 <sup>T</sup>	10	UFLA5	30	BR11001 <sup>T</sup>	30
BR11340 <sup>T</sup>	20	UFLA6	30	BR11175 <sup>T</sup>	30
UFLA1	20	UFLA7	30	UFLA17	50
				<i>A.irakense</i>	50

Do grupo I, UFLA 58, 59, 60 e 69 toleraram concentração de 10 g L<sup>-1</sup> e UFLA 57 não apresentou nenhum crescimento, quando submetido ao estresse salino. Os representantes do grupo J, BR9004 e BR 11340 toleraram 20 g L<sup>-1</sup> NaCl. Os isolados do grupo M apresentaram variações de tolerância: UFLA 37, 10 g L<sup>-1</sup>; 39, 30 g L<sup>-1</sup> e UFLA 53, 20 g L<sup>-1</sup>. Não foi observada nenhuma relação de tolerância à salinidade e origem dos isolados obtidos em áreas submetidas aos diferentes métodos de reabilitação (Tabela 3).

As espécies *A. irakense* isolada de raízes de arroz na região subtropical do Iraque (Khammas et. al., 1989) e *A. halopraeferens* isolada da gramínea

Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.), que cresce em solos salino-sódicos no Paquistão (Reinhold et al., 1987), são tolerantes a até 3% de NaCl. Neste trabalho, *A. irakense* tolerou 5%. O isolado UFLA 17, oriundo da área de Serra reabilitada com bracatingas e apresentado vegetação rasteira e arbustiva em processo de sucessão lento, também apresentou a mesma tolerância desta estirpe. É relatado na literatura (Baldani, 1996), que a estirpe tipo de *Burkholderia brasiliensis* tolera até 1% de NaCl em meio de cultivo semi-sólido específico. Neste trabalho, esta estirpe tolerou 2% de NaCl, quando cultivada em meio batata sólido suplementado com NaCl.

A tolerância ao cloreto de sódio foi avaliada, buscando-se o agrupamento dos isolados em nível fisiológico, para auxiliar a caracterização de espécies distintas de microrganismos. Bactérias Gram-negativas apresentam como componente principal da parede celular um complexo de lipopolissacarídeos que é muito importante, tanto para a manutenção da estabilidade da membrana celular, quanto para o controle parcial de entrada e saída de algumas substâncias da célula para o meio, ou vice-versa (Luderitz et al., 1982). Estudos realizados por Jofré et al. (1998ab), evidenciaram que a capacidade de *Azospirillum brasiliense* (Gram-negativo), tolerar o estresse salino, pode estar associada a uma alteração na produção de lipopolissacarídeos, que confere diferenças morfológicas na parede celular do microssimbionte. Essas diferenças foram evidenciadas pela diminuição e até o desaparecimento da membrana celular externa no tratamento com 300 mM de NaCl que, além de ter causado um decréscimo de 66% no crescimento do microrganismo, também interferiu na capacidade deste em colonizar os hospedeiros milho e trigo (Jofré et al., 1998b). Assim, pode-se inferir que, quanto maior for a capacidade de *Azospirillum* tolerar o estresse salino, maior será o acúmulo de solutos orgânicos (Bashan & Holguin, 1997) e mais espessa será a camada de lipopolissacarídeos envolvendo a bactéria.



### 4.3 Avaliação da forma celular em microscópio ótico

A caracterização morfológica dos isolados e estirpes tipo encontram-se na tabela 7. A largura das células variou de 0,61 a 1,21  $\mu\text{m}$ . A forma variou de vibrio, bastão curvo e bastão. Os movimentos característicos observados foram: giratório rápido e ondulatório, rápido e trajetória, trajetória trêmulo, lento e trêmulo, lento e trêmulo. Houve isolados que formaram, em meio de cultivo, cadeias bacterianas e alguns apresentaram formação de agregação. A presença de PHB somente pôde ser detectada nas células de formato vibrio, nas demais, não foi possível visualização. A estirpe tipo BR11080<sup>T</sup> (Figura 7 a) apresentou formato vibrio, não formação de cadeia, presença de PHB, mobilidade tipo giratório rápido e ondulatório e, largura celular variando de 1,18 a 1,2  $\mu\text{m}$ . Os isolados que se assemelharam com as mesmas características desta estirpe foram: UFLA 2 (Figura 7 b), 15, 22, 25, 27, 29, 34, 35, 37, 39, 43, 44, 45, 46 e 48. A estirpe tipo BR11001<sup>T</sup> (Figura 7 c) apresentou a mesma caracterização celular da estirpe tipo BR11080<sup>T</sup>, variando somente na largura celular de 0,95 a 0,98  $\mu\text{m}$ . Os isolados que se agruparam a esta estirpe foram: UFLA 12 (Figura 7 d), 38, 40, 53 e 72. Os isolados UFLA 1, 20, 32 e 42 (Figura 7 e) apresentaram formato vibrio, grânulos de PHB, não formaram cadeias, movimento rápido, giratório e ondulatório típico do gênero *Azospirillum* com largura variando de 0,91 a 0,94  $\mu\text{m}$  e não se agruparam com as estirpes deste trabalho. A exceção deste grupo foi o isolado UFLA 20 apresentou formação de uma estrutura em forma de cadeia sem septos, extensa (Figura 7 p). As estirpes tipo *Azospirillum irakense* e BR11040<sup>T</sup> apresentaram formato vibrio, PHB, formação de cadeias, movimento giratório ondulatório rápido e largura celular de 0,61  $\mu\text{m}$  e 0,70  $\mu\text{m}$ , respectivamente, sendo que, nenhum isolado se agrupou a estes (Figura 7 f e g). A estirpe BR9004 (Figura 7 h) apresentou forma de bastão, não formação de cadeia, movimento trajetória rápido e largura celular de 0,609  $\mu\text{m}$ . O isolado que se assemelhou a ela, foi o UFLA 36 (Figura 7 i).

Tabela 7 Caracterização morfológica, em microscópio ótico, das células de isolados de bactérias diazotróficas em meio batata semi-sólido.

Isolado	Larg.	Forma	Mob.	Isolado	Larg.	Forma	Mob.
UFLA1	0,94	Víbrio/NC	GR/O	UFLA40	0,99	Víbrio/NC	GR/O
UFLA2	1,20	Víbrio/NC	GR/O	UFLA41	0,61	Bastão /NC	R/T
UFLA3	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA42	0,91	Víbrio/NC	GR/O
UFLA4	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA43	1,18	Víbrio/NC	GR/O
UFLA5	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA44	1,18	Víbrio/NC	GR/O
UFLA6	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA45	1,18	Víbrio/NC	GR/O
UFLA7	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA46	1,06	Víbrio/NC	GR/O
UFLA8	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA47	nd	nd	nd
UFLA9	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA48	1,21	Víbrio/C	GR/O
UFLA10	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA49	nd	nd	nd
UFLA11	0,91	Bastão	T/T	UFLA50	nd	nd	nd
UFLA12	0,99	Víbrio/NC	GR/O	UFLA51	0,82	Bastão C	L/Tre
UFLA13	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA52	0,91	Bastão C	T
UFLA14	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA53	0,99	Víbrio/NC	GR/O
UFLA15	1,20	Víbrio/NC	GR/O	UFLA54	0,91	Bastão C/A	L
UFLA16	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA55	0,91	Bastão C/A	L
UFLA17	0,72	Bastão	T/Tre	UFLA56	0,91	Bastão C/A	L
UFLA18	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA57	0,91	Bastão C/A	L
UFLA19	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA58	0,91	Bastão C/A	L
UFLA20	0,91	Víbrio/C	GR/O	UFLA59	nd	nd	nd
UFLA21	nd	nd	nd	UFLA60	0,91	Bastão C/A	L
UFLA22	1,18	Víbrio/NC	GR/O	UFLA61	0,91	Bastão C/A	L
UFLA23	nd	nd	nd	UFLA62	0,88	Bastão C/A	L/Tre
UFLA24	0,88	Bastão/C	R/T	UFLA63	0,88	Bastão C	L/Tre
UFLA25	1,58	Víbrio/NC	GR/O	UFLA64	0,88	Bastão C	L/Tre
UFLA26	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA65	0,91	Bastão C/A	L
UFLA27	1,21	Víbrio/NC	GR/O	UFLA66	0,85	Bastão C	L/Tre
UFLA28	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA67	0,89	Bastão C/A	L/Tre
UFLA29	1,18	Víbrio/NC	GR/O	UFLA68	0,79	Bastão C	L/Tre
UFLA30	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA69	0,79	Bastão C	L/Tre
UFLA31	0,61	Bastão Cur/NC	R/T	UFLA70	0,91	Bastão C/A	L
UFLA32	0,91	Víbrio/NC	GR/O	UFLA71	0,61	Bastão Cur/NC	R/T
UFLA33	nd	nd	nd	UFLA72	0,95	Víbrio/NC	GR/O
UFLA34	1,09	Víbrio/NC	GR/O	BR 9004	0,61	Bastão/NC	R/T
UFLA35	1,19	Víbrio/C	GR/O	BR11175	0,61	Bastão Cur/NC	R/T
UFLA36	0,61	Bastão/C	R/T	BR11080	1,20	Víbrio/NC	GR/O
UFLA37	1,18	Víbrio/NC	GR/O	BR11040	0,70	Víbrio/C	GR/O
UFLA38	0,95	Víbrio/NC	GR/O	BR11001	0,98	Víbrio/NC	GR/O
UFLA39	1,19	Víbrio/NC	GR/O	<i>A.irakense</i>	0,61	Víbrio/C	GR/O

Larg<sup>1</sup> = Largura (µm); Forma: vibrio, bastão curvo (Cur) e bastão. Mob.<sup>3</sup> = Mobilidade características observadas: giratório rápido e ondulatório (GR/O), rápido e trajetória (R/T), trajetória trêmulo (T/Tre), lento e trêmulo (L/Tre), lento (L) e trêmulo (Tre). Presença e ausência de cadeias bacterianas (C) e (NC), respectivamente. (A): formação de agregação.

A estirpe tipo BR11175<sup>T</sup> (Figura 7 j) apresentou a mesma caracterização celular da estirpe BR9004, variando somente na forma celular, caracterizada como bastão curvado. Os isolados que se agruparam a BR11175<sup>T</sup> foram: UFLA 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 (Figura 7 k), 14, 16, 18, 19, 26, 28, 30, 31, 41 e 71. A BR11340<sup>T</sup> (Figura 7 l) apresentou forma de bastão, formação de cadeia, movimento giratório lento e largura celular variando de 0,787 a 0,848  $\mu\text{m}$ . Os isolados que se agruparam a esta estirpe foram: UFLA 24, 51, 62, 63, 64, 66 (Figura 7 m) e 67. Os isolados UFLA 11, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 65, 68, 69 (Figura 7 n) e 70 (Figura 7 o) apresentaram forma de bastão pequeno, movimento lento, formação de cadeia e não se agruparam a nenhuma estirpe tipo deste trabalho.

As bactérias possuem dimensões extremamente reduzidas, variáveis interespecie e pouco intraespecie. A revelação dessa informação é uma ferramenta auxiliar em estudos de diversidade e caracterização microbiana, pois permite agrupar e conhecer a morfologia celular do microrganismo estudado. Essa informação tem sido pouco explorada nos trabalhos de caracterização.

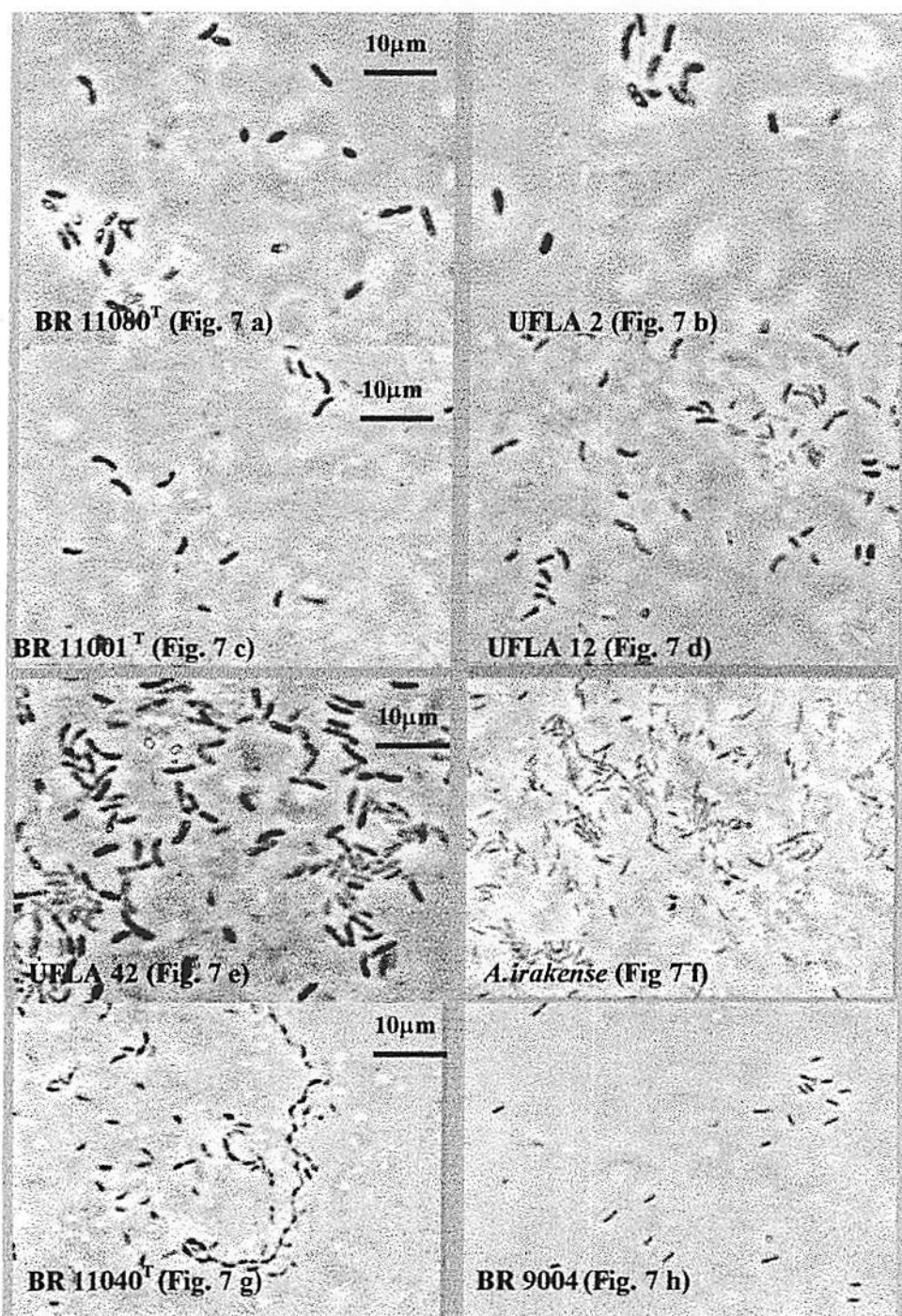


FIGURA 7 Morfologia celular dos representantes de bactérias diazotróficas. Continua...

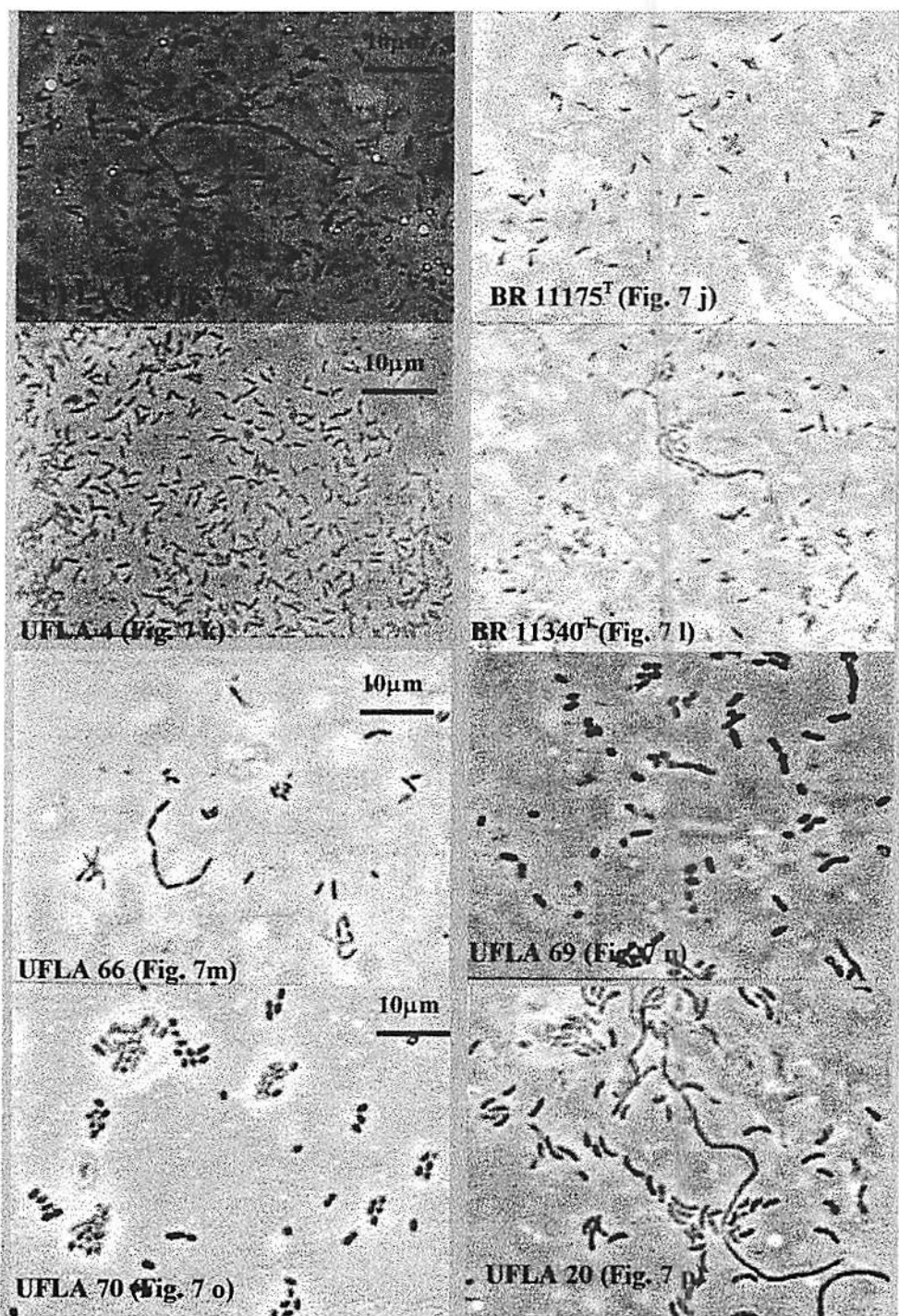



FIGURA 7 Morfologia celular dos representantes de bactérias diazotróficas.



#### 4.4 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os perfis eletroforéticos de proteína total dos isolados de bactérias diazotóficas encontra-se figura 8. Foi possível unir os isolados que apresentaram perfil protéico total semelhante em 8 grupos: grupo I constituído por UFLA 12, 23 e BR11080<sup>T</sup> (*Azospirillum lipoferum*); grupo II: BR11040<sup>T</sup> (*Azospirillum amazonense*); grupo III: UFLA 7, 36, 14 e 71; grupo IV: UFLA 62, 63 e 64; grupo V: UFLA 67 e 69; grupo VI: UFLA 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 16, 18, 19, 21, 24, 26, 28, 30, 31 e 41. O grupo VII: UFLA 15, 27, 32, 33, 34, 35, 42, 46, 47 e 48 e, grupo VIII: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasilense*) UFLA 20, 22, 29, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 49 e 72. Não foi possível o agrupamento visual dos isolados UFLA 11, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 68 e 70 pois, o perfil protéico de alguns não foi revelado no gel. Os isolados UFLA 13, 17 e 25 não foram agrupados visualmente com os demais.

Os perfis eletroforéticos dos representantes dos grupos dos isolados de bactérias diazotróficas e o dendrograma de similaridade podem ser visualizados na figura 9.

Os perfis de proteína total forma bastante diversos, sendo formados 18 grupos em similaridade a 75%. No dendrograma de similaridade, verificou-se que o isolado UFLA 5, oriundo do ecossistema Campo (área referência com espécies graminóides e arbustivas sem alteração antrópica) e UFLA 13, do ecossistema Serra (reabilitado com espécies arbóreas nativas, sub-bosque desenvolvido e adição de serapilheira), foram 77% similares. *A. irakense* e UFLA 42, isolado do ecossistema Serra (reabilitado com bracatinga e sob processo de sucessão lento), foram agrupados ao nível de 68% de similaridade. A 60% de similaridade os representantes BR11040<sup>T</sup> e UFLA 2 (isolada do ecossistema Campo reabilitado com braquiária e guandu) foram agrupados, assim como UFLA 69 (isolada do ecossistema Campo reabilitado com

braquiária e guandu) e UFLA 71 (isolada do ecossistema Serra reabilitado com braquiária, espécies arbóreas e guandu). UFLA 52 isolada do ecossistema Serra (reabilitado com bracatinga e sob processo de sucessão lento), UFLA 25 (reabilitado com capim gordura, guandu e espécies nativas), BR11175<sup>T</sup> e UFLA 1 (isolada do ecossistema Campo reabilitado com braquiária e guandu) foram agrupadas ao nível de 65% de similaridade. As estirpes BR11340<sup>T</sup>, BR11001<sup>T</sup>, BR11080<sup>T</sup> e os representantes dos grupos protéicos (Figura 9), UFLA 17, 20 e 63 e, a estirpe BR9004<sup>T</sup> foram as que apresentaram a maior dissimilaridade em relação aos demais.

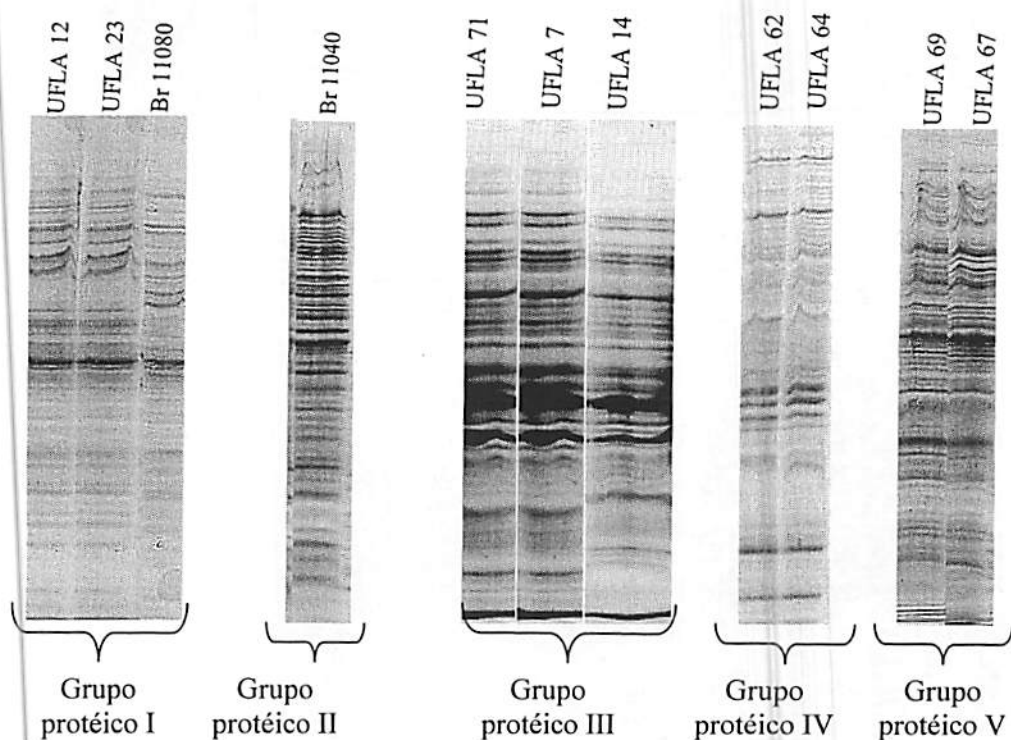
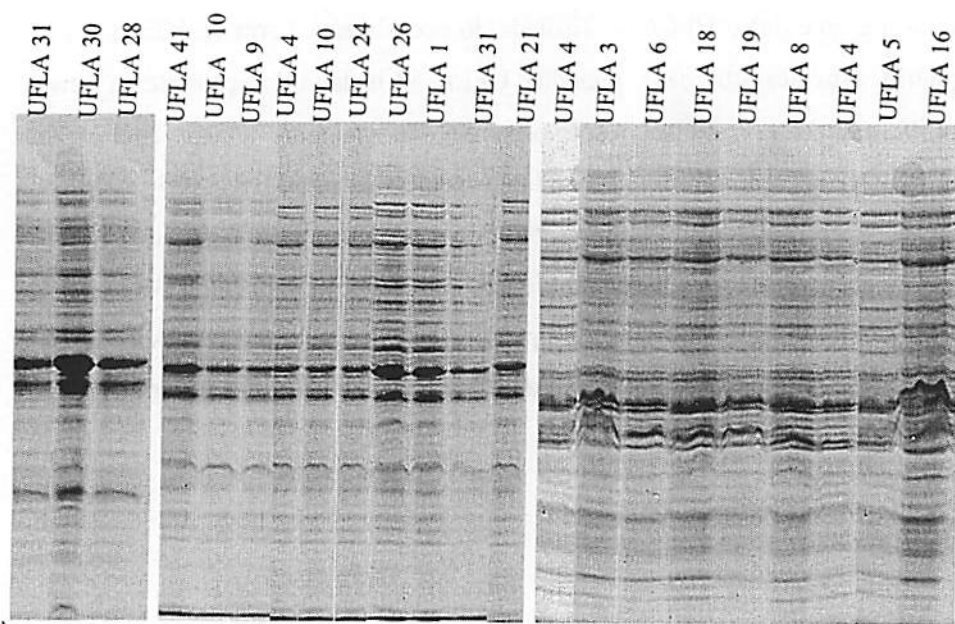
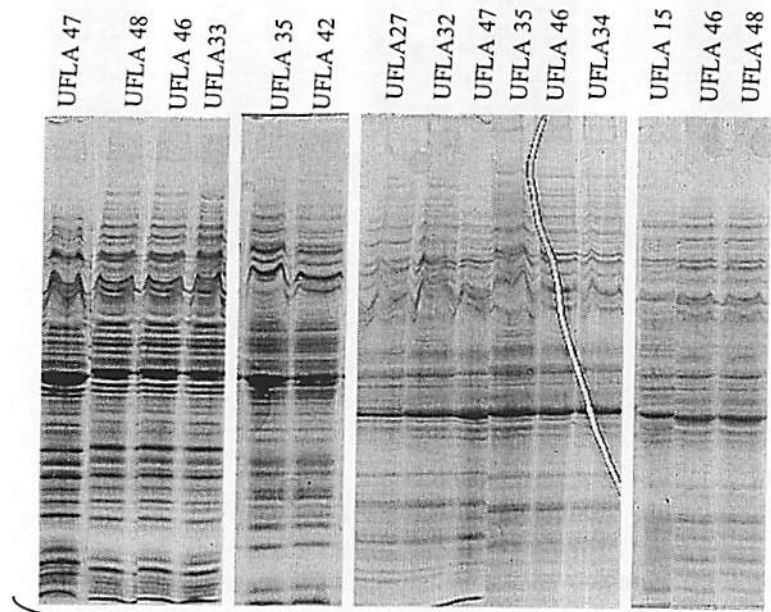


Figura 8 Perfis de proteína celular total de isolados de bactérias diazotróficas obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).  
Continuação...



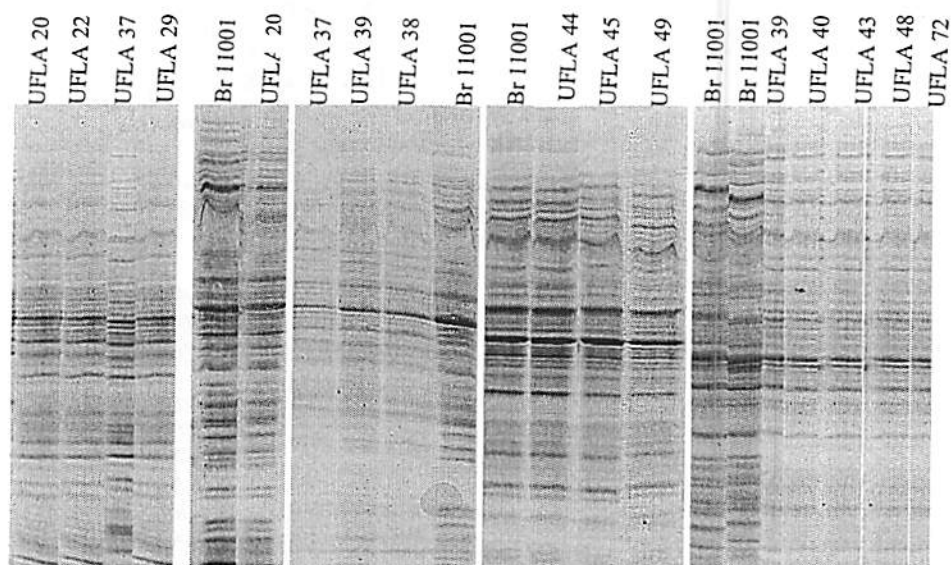
Grupo protéico VI



Grupo protéico VII

Continuação....





Grupo protéico VIII

Figura 8 Perfis de proteína celular total de isolados de bactérias diazotróficas obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

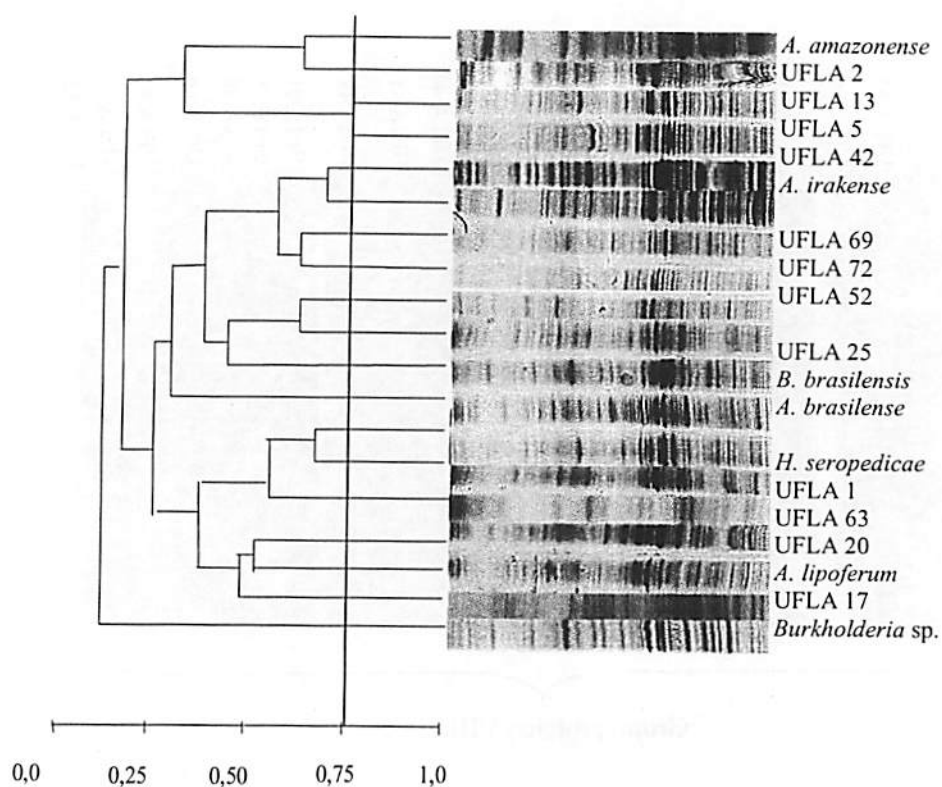


FIGURA 9 Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil protéico total dos isolados bactérias diazotróficas e as estirpes tipo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos isolados diferiu significativamente, tanto na caracterização morfológica cultural, tolerância ao cloreto de sódio e caracterização morfológica celular e proteína total, das estirpes tipo das espécies cujo crescimento é relatado como sendo favorecido nos meios utilizados (NFb, JNFb e Fam). Assim, pode se afirmar que estes meios permitem o isolamento de outras espécies diazotróficas associativas, o que já foi verificado anteriormente (Magalhães & Döbereiner, 1984; Baldani, 1996). A alta dissimilaridade, destes isolados com relação às espécies descritas, indica que eles podem representar novas espécies.

Neste trabalho nenhum dos 72 isolados se assemelhou com *Azospirillum amazonense*, porém no início dos experimentos de isolamento muitos isolados com características culturais semelhantes a esta espécie-tipo foram observados. Com posteriores repicagens estes isolados foram perdidos pois esta espécie é muito sensível à estresses (pH do meio de cultura, temperatura de crescimento, etc.).

De modo geral, houve correlação entre os grupos formados pelo perfil protéico total e grupos obtidos pela caracterização morfológica celular. As exceções só foram observadas para os grupos formados pelas BR 11080 e BR 10001.

A diversidade fenotípica (cultural e protéica) encontrada para bactérias diazotróficas associativas nas áreas em processo de reabilitação, após a mineração da bauxita, pode ser considerada intrínseca, e pode ser atribuída ao processo utilizado para a recuperação da área, e/ou externa. O armazenamento do solo fértil, antes do início da atividade de mineração, pode ter contribuído para a sobrevivência das bactérias diazotróficas. Assim, com a posterior utilização deste substrato na recomposição da área degradada e a revegetação

com capim-gordura, azevém e braquiária houve favorecimento da sobrevivência e multiplicação das bactérias diazotróficas. A diversidade das bactérias estudadas também pode ser atribuída à utilização de sementes de gramíneas, que podem ter servido de veículo (fonte externa) para a disseminação dessas espécies, nas áreas em processo de reabilitação.

## 6 CONCLUSÕES

Houve relação entre os grupamentos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização morfológica celular.

Os meios de cultivo Fam e JNFb considerados específico para *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* sp. também detectam outras espécies.

Os isolados de bactérias diazotróficas, oriundas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas, apresentam alta diversidade fenotípica e podem representar novas espécies.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. et al. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1991. 292p.
- ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, C.A. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ANDREEVA, I.N.; RED'KINA, T.V.; ISMAILOV, S.F. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium* legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Journal Plant and Physiology*, v.40, p. 901-906, 1993.
- BALDANI, J.I.; et al. Fixação biológica do nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O. et al. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras: SBCS/UFLA, 1999. p.621-666.
- BALDANI, J.I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.36, n.1, p.86-93, Jan. 1986.
- BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n. 5-6, p.911-922, May/July 1997.
- BALDANI, J.I. et al. 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*, Washington, v.46, n.3, p.802-810, July 1996.
- BALDANI, V.L.D. 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. 1996. 234p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.
- BALDANI, V.L.D. et al. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility Soils*, Berlin, v.30, p.485-491, 2000.
- BALDANI, V.L.D. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, n.1-3, p.65-73, 1992.
- BALOTA, E.L. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.6, p.627-639, June 1997.

- BARTH, R.C. Avaliação de áreas mineradas no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 41p. (Boletim Técnico, 1).
- BASHAN, Y. Air-bone transmittion of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *FEMS Microbiology Ecology*, Amstedan, v.22, n.3, p.257-269, 1991.
- BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.44, p.168-174, Feb. 1998.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p.103-121, Feb. 1997.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.36, p.591-608, Mar. 1990.
- BASTIAN, F. et al. 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*, Dordrecht, v.24, p.7-11, Jan. 1998.
- BEVIVINO, A. et al. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCL 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, New York, v.31, n.3-4, p.225-231, June 2000.
- BEVIVINO, A. et al. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology-UK*, Reading, v.140, p.1069-1077, party 5, May 1994.
- BIRO, B. et al. Symboint effect of rhizobium-bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *Pisum sativum* in recultivated mine spoils. *Geomicrobiology Journal*, Hants, v.11, n.3-4, p.275-284, July/Dec. 1993.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Graminae. *CGC Critical Reviews in Plant Science*, Boca Raton, v.6, n.3, p.209-266, 1987.
- BODDEY, R.M. et al. The use of the  $^{15}\text{N}$  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*, Ottawa, v.29, n.8, p.924-929, 1983.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, n.1, p.53-65, May 1988.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using <sup>15</sup>N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, n.1-3, p.265-292, 1986.

BORONIN, A.M. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent. **FEMS Microbiology Letters**, Amsteden, v.100, p.461-468, 1992.

BOTTINI, R. et al. Identification of gibberellins A1, A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. **Field & laboratory methods for general ecology**. Dubuque: Iowa Wm. C. Brown, 1977. p.8-20

BROWN, S.; LUGO, A.E. Rehabilitation of tropical lands: a key to sustaining development. **Restoration Ecology**, v.2, n.2, p.97-111, 1994.

CARNEIRO, M.A.C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosequências de reabilitação em áreas de mineração de Bauxita**. 2000. 166p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.)**. 1990. 121p. Dissertação -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CHEN, W.M. et al. *Ralstonia tawwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a Cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.51, p.1729-1735, 2001.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays* L.) nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.17, p.1-8, 1994.

CRUZ, L.M. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.2375-2379, May 2001.

DEKHILL, S.B. et al. 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**, Stuttgart, v.20, n.6, p.72-77, 1997.

- DELL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON, Y, (Ed.). *Azospirillum* plant association. CGC Critical Reviews in Plant Science. Boca Raton, 1994. p.57-75.
- DIAS, L.E.; GRIFFITH, J.J. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. In: DIAS, L.E.; MELLO, J.W.V. (Ed.). *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos; Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas degradadas. 1998. 251p.
- DICELLO, F. et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, n.11, p.4485-4493, Nov. 1997.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, n.1-3, p.1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI; Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. (Ed.). *Nitrogen fixation*. Washington, Washington State University, 1975, v.2, p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. *Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants*. Madison: Springer Verlag, 1987.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.
- DUPUY, N. et al. Phenotypic and genotypic characterization of Bradyhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Great Britain, v.44, n.3, p.461-473, July 1994.
- ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Great Britain, v.51, parte 1, p.17-26, Jan. 2001.
- FIORE, A. et al. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovar among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environmental Microbiology*, Oxford, v.3, n.2, p.137-143, Feb. 2001.
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5-6, p.897-903, May/June 1997.



- GHAI, S.K.; THOMAS, G.V. Occurrence of *Azospirillum* spp. in coconut-based farming systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.114, n.2, p.235-241, Feb. 1989.
- GILLER, K.E; et al. Use of isotope dilution to measure nitrogen fixation associated with the roots of sorghum and millet genotypes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, n.1-3, p.255-263, 1986.
- GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.2274-289, 1995.
- GRIFFITH, J.J. **Recuperação conservacionista da superfície de áreas mineradas: uma revisão de literatura**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1980. 106p. (Boletim Técnico,79).
- HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel eletrophoresis of protein: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University, 1990. 383p.
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum/Plant associations*. **CGC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, p.15-39, 1994.
- ITZIGSOHN, R. et al. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium melilot* and alfafa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasiliense*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, n.6, p.610-615, June 1993.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical Methods in Bacterial Systematics**. London: Academic, 1985. p.119-129.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, p.197-209, 2000.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **CGC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.17, p.77-119, 1997.
- JIMÉNEZ-SALGADO, T. et al. *Coffea arabica* L.: a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied of Environmental of Microbiology**, Washington, v.63, p.3676-3683, 1998.
- JOFRÉ, E. et al. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasiliense* Cd to maize and wheats roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.929-936, 1998b.

JOFRÉ, E. et al. Differential gene expression in *Azospirillum brasiliense* Cd under saline stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.929-936, 1998a.

KAMPFER, P. Differentiation of *Brevibacterium* species by electrophoretic protein-patterns. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.17, n.4, p.533-535, Feb. 1995.

KHAMMAS, K.M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, n.9, p.679-693, Nov. 1989.

KIRCHHOF, G. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen - fixing bacterial species that occurs in C4 - fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.27, p.680-685, 1970.

LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicol* a gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.48, p.1277-1290, 1998a.

LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of tree rhizobium pluriforium sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.48, p.369-382, 1998b.

LANGE, A. et al. Densidade de diazotróficos associativos em amostras de raiz e de solo contaminados com metais pesados. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. Resumos... Lavras: UFLA/SBCS/SBM, 1998. p.250

LANGE, A.; MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, n.2, p.535-543, 2002.

LORENZO, J.A. Regeneração natural de uma área minerada de bauxita em Poços de Caldas, MG. 151p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LUDERITZ, O. et al. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. **Current topics in membranes and transport**. Academic Press, New York. v.17, 1982.

- MAGALHÃES, F.M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.
- MAGALHÃES, F.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, Out./Dez., 1984.
- MAGALHÃES, F.M. et al. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.39, p.587-596, 1979.
- MALIK, K.A. et al. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.194, n.1-2, p.37-44, July 1997.
- MARTINS, C.R. et al. Recuperação de uma área degradada pela mineração de cascalho com uso de gramíneas nativas. *Revista Árvore*, Viçosa, v.25, n.2, p.157-166, abr./jun. 2001.
- MELLONI, R. **Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita.** 2001. 173 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MELLONI, R. et al. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. *Revista Árvore*, Viçosa, v.24, n.3, p. 309-315, 2000.
- MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, submetido, 2002
- MINERDI, D. et al. Nitrogen fixation genes in a endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.67, n.2, p.725-732, Feb. 2001.
- MINTER-IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação.** Brasília: IBAMA, 96p. 1990.
- MIRANDA, R.U. et al. Avaliação do banco de sementes em dunas de rejeito de mineração de rutilo e ilmenita no litoral norte do estado da Paraíba. *Revista Árvore*, Viçosa, v.22, n.3, p.367-372, 1998.
- MOREIRA, F.M.S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic Applied Microbiology*, Jena, v.16, n.1, p.135-146, Apr. 1993.
- MOREIRA, F.S.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica dos solos.** Lavras: UFLA, 2002. 626p.

- MOTTA, J.S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas.** Lavras: UFLA, 2002. 43p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MOTTA, J.S. et al. Bactérias diazotróficas associativas em amostras de solo tratados com biossólido industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., Londrina, 2001. **Anais...** Londrina, 2001.
- MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, v.411, n.21, p.948-950, June 2001.
- NOSKO, P.; BLISS, L.C.; COOK, F.D. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of high arctic graminoids. *Arctic and alpine research*, Boudier, v.26, n.2, p.180-186, May 1994.
- OKON, Y. *Azospirillum*: as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v.3, n.9, p.223-228, 1985.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, n.12, p.1591-1601, Dec. 1994.
- OLDEMAN, L.R. **The global extent of soil degradation.** In: **Soil resilience and sustainable land use.** GREENLAND, D.J.; SZABOCLS, I. (Ed.). Wallingford, UK: Cab International, 1994. p.99-118.
- OLIVARES, F.L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Graminae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.21, n.3, p.197-200, Feb. 1996.
- OLIVARES, F.L. et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, New York, v.135, n.4, p.723-737, Apr. 1997.
- OLUBAYI, O. et al. Differences in chemical composition between nonflocculated and flocculated *Azospirillum brasiliense* Cd. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.44, n.4, p.386-390, Apr.1998.
- PATEL, D. **Gel electrophoresis: essential data series.** New York: J. Wiley, 1994. 146p.
- PAULA, M.A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares-bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., 1992. 168p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.**

POGGIANI, F.; MONTEIRO, C.C. Efeito da implantação de maciços florestais puros na reabilitação do solo degradado pela mineração de xisto betuminoso. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1990, Campos do Jordão. Anais... Campos de Jordão, 1990. p.275-281.

RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: GAETANO-ANOLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). DNA markers: protocols, applications and overviews. New York: J. Wiley, 1997.

RADWAN, T.S.D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-Acetic by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*, Rehovot, v.32, p.39-54, 2002.

RAO, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.29, n.8, p.863-866, 1983.

REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.37, n.1, p.43-51, Jan. 1987.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasiliense*. *Soil Biology Biochemistry*, Great Britain, v.11, p. 547-548, 1979.

RIGGS, P.J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant and Physiology*, v.28, p.829-836, 2001.

RUDNIK, P. et al. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biology Biochemistry*, Great Britain, v.29, n.5-6, p.831-841, 1997.

SANTOS, P.E.L.; CRISTALES, R.B.; MELLADO, J.C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.67, n.6, p.2790-2798, June 2001.

SIEVER, M. et al. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.21, p.505-508, 1998.

SILVA, G.P. Caracterização química, física e mineralógica de materiais provenientes da mineração de ferro e comportamento de plantas para sua revegetação. 1994. 76p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SIQUEIRA, J.O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental.** Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.

TARRANT, J.J., KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. 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**, Ottawa, v.24, p.976-980, 1978.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBLEL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effects on the growth of *Pennisetum americanum* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society America Journal**, v.56, n.1, p.105-114, Jan./Feb. 1992.

VANDAMME, P. et al. Intra-and interspecific relationships of veterinary campylobacters revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.13, n.3, p.295-303, 1990.

VANDAMME, P. et al. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n.4, p.1055-1060, Oct. 1997.

VICTORIA, L.; LOVELL, G. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.40, p. 705-711, 1994.

VOLPN, H.; KAPULNIK, Y. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum*: plant association. **CGC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, p. 111-118, 1994.

WALLAND, M.E.; ALLEN, E.B. Relationships between VA mycorrhizal fungi and plant cover following surface mining in Wyoming. **Journal of Range Management**, v.40, n.3, p.271-276, May 1987.

WEBER, O.B., BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2277-2285, Nov. 2000.

WEBER, O.B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, n.1, p.103-113, 1999.

WEBER, O.B. et al. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.201-205, 2001.

WILLIAMS, D.D.; MORAES, C.A.F. Recuperação de minas de bauxita com espécies nativas de Poços de Caldas-MG. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná/Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1992. p.273-279.

YABUUCHI, E. et al. 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**, v.36, p.1251-1275, 1992.

YAHALOM, E. et al. Effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymorpha* L.) **Israel Journal of Botany**, Jerusalém, v.40, n.2, p.155-164, 1991.

YANO, D.M.Y. et al. Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias. Campinas, 1993. Apostila.

YONEYAMA, T. et al. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.189, p.239-244, 1997.

ZIMMER, W.; ROEBEN, K.; BOTHE, H. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. **Planta**, New York, v.176, n.3, p.333-342, Dec. 1988.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

**ANEXOS**

Faint, illegible text in the middle section, likely containing the start of an appendix or list of contents.



**ANEXO A**

**Página**

1A	Composição dos meios de cultura.....	64
2A	Protocolo para proteína total SDS-PAGE.....	65

## 1A. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

NFb (Döbereiner et al., 1980)	JNFb (Baldani et al., 1992)
Ácido málico.....5 g	Ácido málico.....5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....0,5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....0,6 g
Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....1,8 g
NaCl.....0,1 g	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0,02 g	NaCl.....0,1 g
Solução de micronutrientes <sup>#</sup> ...2 mL	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0,02 g
Azul de bromotimol (0,5% em 0,2N NaOH).....2 mL	Solução de micronutrientes <sup>#</sup> .....2 mL
Solução de vitaminas* .....1 mL	Azul de bromotimol (0,5% em 0,2N NaOH) .....2 mL
Fe EDTA solução (1,64%)..... 4mL	Fe EDTA solução (1,64%).....4mL
pH 6,8.....4,5 g de KOH	Solução de vitaminas* .....1 mL
Completar para 1000mL	pH 5,8 .....completar para 1000mL
1,75 g de ágar p/ meio semi-sólido	1,75 g de ágar p/ meio semi-sólido

Meio Batata (Döbereiner et al., 1995)	Observação
200g batata cozida em 500mLH <sub>2</sub> O	Filtrar o caldo da batata cozida.
Ácido málico.....2,5g	Misturar as quantidades de ácido málico e açúcar em 50 mL de água destilada e ajustar o pH para 6,5-7,0. Adicionar ao filtrado essa solução e as soluções de vitamina e micronutrientes
Açúcar cristal.....2,5g	
Solução de micronutrientes <sup>#</sup> .....2,0 mL	
Solução de vitaminas* .....1 mL	
pH 6,5-7,0.....completar para 1000 mL	

Fam (Magalhães, 1983)
Sacarose.....5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....1,8 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....0,5 g
Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0,02 g
NaCl.....0,1 g
Fe EDTA solução (1,64%).....4mL
Solução de vitaminas* .....1 mL
Solução de micronutrientes <sup>#</sup> .....2 mL
Completar para 1000 mL
pH 6,0
Ágar.....1,75 g/L

**\* Solução de vitaminas**

Biotina.....	10 mg
Pyridoxina.....	20 mg
Água estéril.....	100mL

**Observação:** Dissolver em banho maria e manter em geladeira

**# Solução de micronutrientes**

CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O.....	0,04 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	1,20 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1,4 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O.....	1,0 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O.....	1,175 g

**Observação:** Completar o volume para 1000 mL com água destilada

**2A PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA TOTAL POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS (Utilizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Ghent, Bélgica)**

**1.1) EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS**

- 1) Multiplicar a bactéria em meio sólido adequado para o cultivo da espécie, à 28° c, para verificação de pureza.
- 2)
  - a) Repicar colônias isoladas para meio TY sólido (pode ser ágar inclinado) duas vezes sucessivas.
  - b) Inocular colônias isoladas em meio TY líquido (50 mL), à 28° C (bactérias de crescimento rápido por 48h e as de crescimento lento por 72 h.), sob agitação constante (120 rpm).
- 3) Centrifugar a 10000 rpm por 10 min., à 4° C.
- 4) Descartar o sobrenadante.
- 5) Lavar as células através de ressuspensão do 'pellet' em 30 mL de tampão NaPBS e submetê-las a nova centrifugação.
- 6) Descartar o sobrenadante e repetir a lavagem por mais duas vezes.

7) Pesar, para cada isolado, as células em um Eppendorf limpo. O peso úmido das células deve ser de 70 mg.

8) Adicionar 0,9 mL do tampão de tratamento da amostra (STB sem SDS) e misturar com Vórtex.

9) Adicionar 0,1 mL de solução SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e misturar com o Vórtex.

10) Aquecer a mistura à 95°C por 10-15 min, esfriar e centrifugar a 10000 rpm por 8 min.

11) Verter o sobrenadante (extrato de proteína) em dois tubos Eppendorf limpos. A parte menor, para uso diário, é armazenada a -20°C e a parte maior, para armazenamento mais longo, a -80°C, por até três anos.

Obs.: Entre os passos 9 e 10 a suspensão bacteriana resfriada pode ser tratada por ultra-som (sonda com ponta tipo agulha - 127 mm, 4mm diâmetro), durante 5 segundos, posição "low", máximo de 50 W.

## 1.2) PREPARAÇÃO DO GEL DE SDS-PAGE NAS PLACAS (modificado de Laemmli, 1970).

### A) Preparação do gel de separação de concentração 12%

1) Misturar em um ernemayer limpo:

H <sub>2</sub> O (bidestilada) .....	13,4 mL
1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação) .....	10 mL
Bis-Acrilamida (30% T; 2,67%C) (solução de monômeros) .....	16 mL

2) Aquecer a mistura acima aproximadamente à 19°C por aproximadamente 3 min.

3) Adicionar na mistura aquecida:

SDS 10%.....	0,4 mL
TEMED.....	20 µL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 10% (APS) .....	0,14 mL

(pH da solução de APS recém preparada (fresca 1 hora no máximo) deve estar entre 5-6).

4) Misturar bem (agitando o frasco, erlenmeyer, que contém a solução do gel) e verter 28ml da solução imediatamente entre as placas de vidro. O nível de gel de separação deve ser aproximadamente 12,6 cm da base.

5) Colocar o conjunto submerso em banho-maria à 19° C.

6) Cobrir com 2ml de isobutanol saturado com água para manter a condição de anaerobiose e obter uma superfície plana.

7) Deixar polimerizar no banho-maria por 1h à 20° C. Após 1 hora descartar o isobutanol, lavar a superfície do gel com bastante água bidestilada e cobrir com 1,6 mL de tampão do gel de separação (diluído 1:4) contendo 0,1% de SDS.

8) Proceder a polimerização por 24 h (ou só durante a noite) em temperatura ambiente (à 20°C).

**B) Preparação do gel de empilhamento (concentração) a 5% (pelo menos 1 hora antes de “carregar”o gel).**

1) Descartar o líquido sobrenadante e lavar com água bidestilada, remover o excesso do líquido, virando as placas de cabeça para baixo para escoar.

2) Misturar os seguintes componentes em frasco:

H <sub>2</sub> O (bidestilada) .....	5,7mL
0,5 M Tris HCl (pH 6.8) (tampão do gel empilhamento).....	2,5mL
Bis-Acrilamida (30%T, 2.67%C) solução de monômeros .....	1,7 mL

3) Aquecer a mistura até, aproximadamente, 19°C por 3 min. em banho maria

4) Adicionar os seguinte componentes na mistura:

SDS10%.....	0,1mL
TEMED.....	10 µL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 10% (APS) .....	0,05ml

(pH da solução de APS preparada fresca deveriam estar entre 5-6).

Misturar bem com um bastão de vidro.

5) Antes de colocar a solução do gel de empilhamento na superfície do gel de separação, lave a superfície com alguns mL da solução do gel de empilhamento.

6) Aplicar a solução do gel de empilhamento (concentração) em cima do gel de separação polimerizado à temperatura ambiente.

7) Inserir o pente entre as placas para formar de 15 ou 20 aberturas (poços).

8) Deixar polimerizar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min.

9) Remover o pente e preencher as aberturas (poços) com o tampão de empilhamento (1:4) contendo 0,1% de SDS, e após enxaguar 2x com água bidestilada, esperar 30 min.

10) Aplicar as amostras de proteína extraída, encher as aberturas (poços) com tampão de corrida recém preparado, e a seguir, lavá-lo duas vezes com a mesma solução.

### **C) Eletroforese de proteína solubilizada com SDS**

1) Marcar as aberturas com os números desejados e aplicar o extrato de proteína em cada uma das aberturas (poços) usando uma micropipeta. O volume a ser aplicado é em microlitros e depende da concentração do extrato de proteína.

2) O volume final em cada poço é ajustado a 15 $\mu$ L (com tampão de tratamento da amostra contendo 0.001% de azul de Bromofenol-linha de corrida). No caso de um extrato de proteína muito diluído, não deve ser aplicado um volume maior. Preencher os poços com tampão de corrida.

1. Prender o reservatório superior em cima das placas e remover a parte de baixo (prenda bem os parafusos).
2. Imergir as placas de gel na cuba cheia com tampão de corrida Tris Glicina (não mais velho que 7 dias). Ligue o banho térmico a 15°C, verifique se as mangueiras não estão dobradas.
3. Colocar vagarosamente tampão de corrida (tris-glicina SDS) fresco no reservatório superior e verifique se não há vazamento.
4. Ligar a corrente a 5.5 MA para cada placa (correspondendo a aproximadamente 18 volts) e deixar correr a corrente constante até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 9.5 cm do topo do gel de separação (comprimento total do gel de separação: aproximadamente 12,6 cm; comprimento total de gel de separação + gel empilhador / (fundo de aberturas): aproximadamente 14 cm).
5. Desligar a corrente e tirar as placas da cuba.
6. Remover os grampos que seguram o gel, retirar os espaçadores e inserir uma espátula de plástico plana para soltar as placas de vidro. Nunca use um objeto de metal pois, lascará as placas de vidro. Retirar o gel de empilhamento deixando permanecer o gel de separação. Fazer a marca de início da aplicação das amostras e colocar o gel na solução de coloração .

7. Após 12 horas retirar o gel da solução de coloração e colocar na solução de descoloração (revelação), trocando a solução caso precise. Quando as bandas eletroforéticas estiverem nítidas e o resto do gel transparente, passar para a solução de fixação e armazenar sob refrigeração.
8. Quando for secar o gel, se ele estiver com o tamanho adequado, deve-se colocá-lo na solução secante por aproximadamente 1 hora. Colocar um bastidor e uma folha de papel celofane umedecido em água destilada. Acima do papel umedecido colocar o gel e novamente outra folha de celofane umedecido formando um sanduíche. Fechar o bastidor e esticar o papel deixando-o secar. Caso o gel não estiver no tamanho adequado, deixá-lo em água destilada por meia hora, antes de colocá-lo na solução secante.

**D) Meios de cultura e soluções utilizados no protocolo para análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de bactérias Gram-Negativas**

**Meio de cultura TY**

Tryptona.....	5g
Extrato de levedura.....	0,75g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,454g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	1,79g
H <sub>2</sub> O destilada.....	completar para 1000mL
pH 6,8-7,8	

**Observação:** Solução CaCl<sub>2</sub> (autoclavar em frasco individual) 20g CaCl<sub>2</sub> .2 H<sub>2</sub>O em 100mL H<sub>2</sub>O. No momento da inoculação, acrescentar 0,25mL para cada 50ml de meio de cultura (TY).

**Tampão de lavagem das células (NaPBS)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O 0,2M.....	40,5ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O 0,2M.....	9,5ml
NaCl.....	8,0 g
H <sub>2</sub> O bidestilada.....	completar para 1000mL
pH 7,3.....estocar a 4°C	

**Tampão de tratamento da amostra (TTA)**

Mercaptoetanol.....	5mL
Glicerol.....	10mL
Tris-HCL.....	0,75 g
H <sub>2</sub> O bidestilada.....	completar para 100mL
pH 6,8.....	estocar à -18° C

**Observação:** (0,75 g Tris + 50 mL de água destilada + 3,45 mL 1,72 N HCl ajuste o pH para 6,8). Depois de adicionar o mercaptoetanol + 10 mL de glicerol e ajuste para 100 mL.

**A - Tampão do gel de separação      B - Tampão gel de Empilhamento**

Tris (1,5M).....	18,15 g	Tris base (0,5M) .....	6,0 g
H <sub>2</sub> O.....	completar para 100 mL	H <sub>2</sub> O.....	completar para 100 mL
pH 8,8.....	estocar à 4°C	pH 6,8.....	estocar à 4°C

**Observação:**

**A-** Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 24,2 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 8,8e completar o volume restante com água bidestilada.

**B-** Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 29 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 6,8 e completar o volume restante com água bidestilada.

**Solução estoque de SDS (10%)****Solução estoque de APS (10%)**

10g SDS.....	100mL H <sub>2</sub> O destilada	0,1g APS.....	1mL H <sub>2</sub> O destilada
--------------	----------------------------------	---------------	--------------------------------

**Gel de separação (para 1 gel)****Gel de concentração (para 1 gel)**

H <sub>2</sub> O bidestilada.....	9,6 mL	H <sub>2</sub> O bidestila.....	6 mL
Bis acrilamida.....	12,5 mL	Bis acrilamida.....	1,34 mL
Tris-HCl 1,5M pH:8,8.....	7,5 mL	Tris-HCl 1,5M pH:8,8.....	2,5 mL
SDS (10%).....	300µL	SDS (10%).....	100µL
APS (10%).....	15µL	APS (10%).....	50µL
TEMED.....	10µL	TEMED .....	5µL



**Tampão de Corrida (Tampão Tris-Glicina)**

Tris.....	12,0 g
Glicina.....	57,5 g
SDS.....	4 g
H <sub>2</sub> O bidestilada.....	completar para 4000 mL

pH 8,59 à 19°C

**Observação:** Preparar minutos antes de começar a eletroforese.

**Solução de Monômeros**

Acrilamida.....	29,2g
Bis-acrilamida.....	0,8g
H <sub>2</sub> O bidestilada completar para 100 mL.....	filtrar e armazenar à 4° C

**Observação:** Imediatamente após dissolver os compostos em água (processo endotérmico), o volume é ajustado e a solução deverá sempre permanecer gelada.

**Solução estoque de SDS (20%):** 20 g de SDS e completar o volume para 100mL com água destilada. Estocar a temperatura ambiente (Não colocar na geladeira).

**Volumes de STB e SDS para a preparo do extrato de célula (1/20 diluição):**

Peso de células úmidas em mg	STB (sem SDS) em mL	SDS 20% em mL
70	0,9	0,1

**Revelação de proteínas totais:**

<b>*Solução de coloração</b>		<b>*Solução fixadora</b>	
Metanol.....	400mL	Metanol.....	450mL
Ác. Acético.....	70mL	Ác. acético.....	100mL
Coomassie Blue R250.....	0,5 g	H <sub>2</sub> O destilada.....	1000mL
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000mL		
<b>*Solução descolorante</b>		<b>*Solução secante</b>	
Metanol.....	400mL	Metanol.....	650mL
Ác. Acético.....	70mL	Glicerol.....	5mL
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000mL	H <sub>2</sub> O destilada.....	1000mL