

**Como isolar e  
identificar bactérias  
diazotróficas de plantas  
não-leguminosas**

*Johanna Döbereiner*

*Vera Lúcia Divan Baldani*

*José Ivo Baldani*



EMBRAPA



Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia - CNPAB

# Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas

**JOHANNA DÖBEREINER,**  
Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. Ph.D. Microbiologista do Solo

**VERA LÚCIA DIVAN BALDANI,**  
Ciên. Agrícolas, M.Sc, Microbiologista do Solo

**JOSÉ IVO BALDANI,**  
Eng. Agr. Ph.D. Microbiologista do Solo

**EMBRAPA - SPI**  
Brasília - DF  
1995

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**CNPAB - EMBRAPA**

Antiga Rodovia Rio - São Paulo BR-465 - Km 47

Caixa Postal 74505 Seropédica

CEP 23851-970, Itaguaí - Rio de Janeiro

Fone: (021) 682-1500 Fax: (021) 682-1230

Telex: (21) 32723

E-mail: CNPAB@RISC.UFRRJ.br

**SPI - Serviço de Produção de Informação**

SAIN - Parque Rural, - W3 Norte - Final.

Caixa Postal 040315

CEP 70770-901 Brasília, DF

Tel. (061) 348-4236 Fax (061) 272-4168

Produção e Coordenação Editorial: Araquem Calháo Motta

Marina Aparecida S. de Oliveira

Revisão Editorial: Francisco C. Martins

Terezinha S. Gomes Quazi

Capa: Mayara Rosa Carneiro

Editoração Eletrônica: José Ilton Soares Barbosa

Fotolitos, Impressão e Acabamento: EMBRAPA-SPI

Tiragem: 1.000 exemplares

---

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** - Brasília : EMBRAPA - SPI : Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

ISBN 85-85007-65-6

1. Bactéria - Nitrogênio - Fixação - Isolamento - Manual.  
2. Bactéria - Nitrogênio - Fixação - Identificação. 3. Planta gramínea. I. BALDANI, Vera Lucia Divan. II. BALDANI, J. I. III. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Itaguaí, RJ). IV. EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação (Brasília, DF). I. Título.

CDD 589.90202

---

©EMBRAPA - 1995

## **Agradecimentos**

***O**s autores agradecem a valiosa colaboração do técnico de laboratório, Geraldo Baeta da Cruz, pelo preparo das placas e repicagem das culturas; dos pesquisadores Paulo Augusto da Eira e Verônica Massena Reis, pela correção do texto; de Dorimar dos Santos Felix, pela organização das bibliografias, e de Teresa Cristina Souto Silva, pela datilografia do texto.*



## Apresentação

***E**sta obra foi preparada para atender à grande demanda de estudantes e pesquisadores que desenvolvem pesquisas na área de fixação biológica de nitrogênio no Brasil e na América Latina. A pesquisa com bactérias diazotróficas associadas às gramíneas ganhou um grande impulso, principalmente a partir do reconhecimento em nível mundial, na década de 70, da contribuição desta associação para o sistema solo/planta. O Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia é pioneiro nos estudos com essas bactérias, sendo sua equipe de pesquisadores responsável pelo isolamento e identificação de pelo menos sete novas espécies diazotróficas descritas.*

*Neste livro, apresentamos os métodos de isolamento e caracterização dos principais grupos de bactérias diazotróficas aeróbias e endófitas, até então conhecidos. Além disso, são mencionados os métodos de esterilização de raízes, folhas, colmos e sementes, normalmente usados nos estudos de isolamento de bactérias diazotróficas. São relatados, também, o método de contagem em placas e meio de cultura semi-sólido, assim como os métodos para manutenção dos isolados. Por fim, são apresentadas algumas sugestões de como proceder para o isolamento e identificação de novas bactérias diazotróficas.*

*Esperamos que o conteúdo desta obra – que reúne os conhecimentos práticos adquiridos durante os últimos 40 anos de pesquisa – incentive outros grupos a desenvolverem pesquisa na área de fixação biológica de nitrogênio, que acreditamos será o alicerce para a agricultura sustentável no futuro.*



# Sumário

INTRODUÇÃO GERAL .....	9
1 - MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS AERÓBIOS..	11
1.1 - <i>Azotobacter e Azomonas</i> .....	11
1.1.1 - Distribuição ecológica .....	11
1.1.2 - Isolamento .....	12
1.1.3 - Caracterização .....	13
1.2 - <i>Beijerinckia e Dersia</i> .....	13
1.2.1 - Distribuição ecológica .....	13
1.2.2 - Isolamento .....	14
1.2.3 - Caracterização .....	16
1.3 - <i>Azospirillum spp</i> .....	19
1.3.1 - Princípio da metodologia .....	19
1.3.2 - Distribuição ecológica .....	21
1.3.3 - Isolamento .....	21
1.3.4 - Caracterização .....	25
2 - MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS	
ENDOFÍTICOS .....	28
2.1 - Princípio da metodologia .....	28
2.2 - <i>Herbaspirillum spp</i> .....	28
2.2.1 - Distribuição ecológica .....	28
2.2.2 - Isolamento .....	29
2.2.3 - Caracterização .....	30
2.3 - <i>Azoarcus spp</i> .....	31
2.3.1 - Distribuição ecológica .....	31
2.3.2 - Isolamento .....	31
2.3.3 - Caracterização .....	31
2.4 - <i>Acetobacter diazotrophicus</i> .....	32
2.4.1 - Distribuição ecológica .....	32
2.4.2 - Isolamento .....	32
2.4.3 - Caracterização .....	34



3 - PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO .....	36
3.1 - Raízes, caules e folhas .....	36
3.2 - Sementes .....	37
4 - CONTAGEM DE MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS .....	39
4.1 - Meio Semi-Sólido .....	39
4.2 - Em placas .....	39
5 - MANUTENÇÃO DAS CULTURAS .....	43
5.1 - Meio de Cultura Inclinado .....	43
5.2 - Liofilizado .....	43
5.3 - Glicerol e nitrogênio líquido.....	44
6 - REQUISITOS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS .....	45
7 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	47
7.1 - Meio de Cultura LG.....	47
7.2 - Meio de Sílica-Gel .....	47
7.3 - Meio de Cultura LGD.....	48
7.4 - Meio de Cultura NFb .....	49
7.5 - Meio de Cultura Batata .....	50
7.6 - Meio de Cultura LGI .....	51
7.7 - Meio de Cultura JNFb .....	51
7.8 - Meio de Cultura LGI-P .....	52
7.9 - Meio de Cultura Batata-P .....	52
7.10 - Solução de hipoclorito acidificado .....	52
7.11 - Solução salina para diluição .....	53
7.12 - Meio F .....	53
7.13 - Solução de liofilização .....	53
BIBLIOGRAFIA .....	55

## Introdução Geral

O conceito básico de bactérias aeróbias diazotróficas, isto é, bactérias que usam  $N_2$  como única fonte de N para seu crescimento, somente incluiu, até a década de 70, bactérias capazes de crescerem em placas sob concentrações de  $O_2$  do ar. Essa característica, devido à sensibilidade extrema da nitrogenase ao  $O_2$ , requer mecanismos que protejam esta enzima contra o  $O_2$ , mesmo que precisem dele para a respiração e geração de ATP. Este mecanismo é conhecido como proteção respiratória, isto é, respiração extremamente elevada para escoar o  $O_2$  do sítio da enzima nitrogenase. As bactérias desse tipo pertencem aos gêneros *Azotobacter* e *Azomonas*. O muco muito denso das cápsulas nos gêneros *Beijerinckia* e *Derxia*, por outro lado, oferece uma proteção mecânica contra o  $O_2$ . Membros desses quatro gêneros formam as únicas bactérias fixadoras de  $N_2$  aeróbias conhecidas até a década de 70.

A elucidação dos mecanismos do funcionamento da nitrogenase ajudou no desenvolvimento de novos métodos de isolamento de bactérias diazotróficas que não possuem mecanismos de proteção contra o  $O_2$  e portanto são muito mais eficientes em relação ao uso de fontes de C para a fixação de  $N_2$ . Essas bactérias foram identificadas como as que vivem em associação, principalmente com as gramíneas. Bactérias desse grupo pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Acetobacter*.

Neste livro, são descritos os métodos mais eficientes para o isolamento e identificação desses dois grupos de bactérias.



---

## MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS AERÓBIOS

### 1.1- *AZOTOBACTER E AZOMONAS*

#### 1.1.1- DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

Dentre as espécies de *Azotobacter* conhecidas, as mais comuns são *A. chroococcum*, *A. vinelandii* e *A. paspali*, sendo a espécie *A. paspali* a mais estudada ecologicamente. Essa espécie apresenta uma associação bastante específica com a gramínea *Paspalum notatum* cv. *batatais* (Döbereiner, 1966). Cerca de 98% de amostras de *P. notatum* testadas mostraram a ocorrência dessa bactéria, principalmente no rizoplano. Um estudo mais detalhado de sua ocorrência em outras cultivares de *Paspalum* confirmou a estreita associação com o ecotipo *P. notatum* cv. *batatais* e em menor percentagem com *P. plicatum*, *P. dilatatum* e *P. vergatum* (Döbereiner, 1970). Essa espécie também não foi encontrada em amostras de outras espécies de gramíneas e plantas leguminosas (Döbereiner & Campêlo, 1971). A capacidade dessa bactéria em fixar N<sub>2</sub> em associação com *P. notatum* cv. *batatais* foi estimada em 30kg N/ha/ano através do uso de <sup>15</sup>N (Boddey et al., 1983).

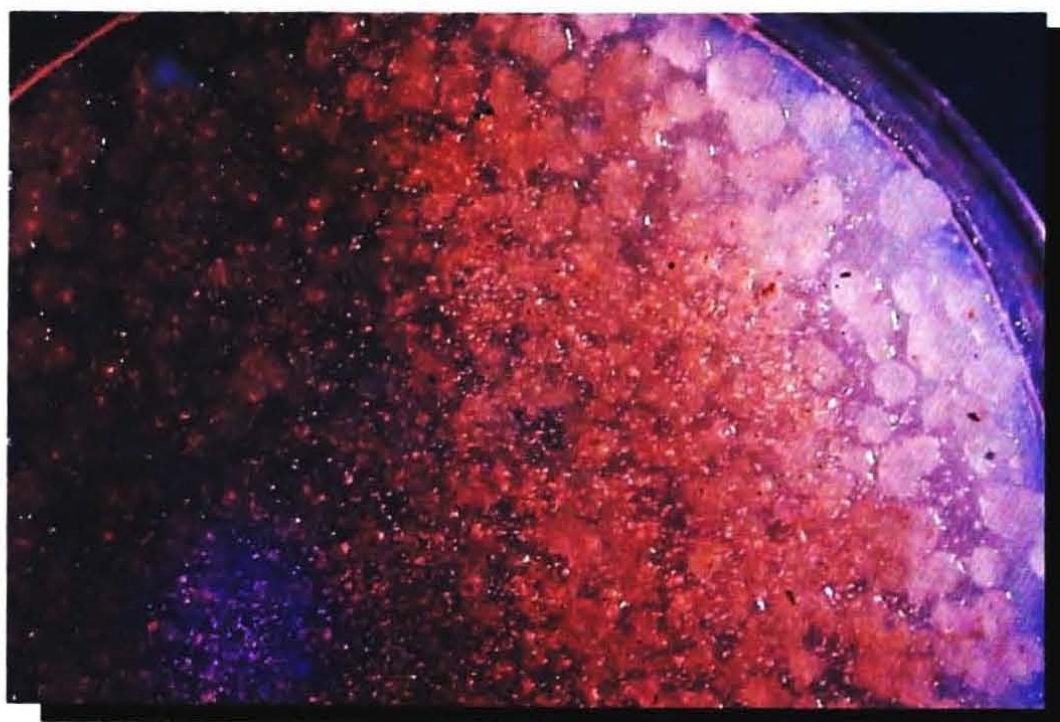
*Azotobacter vinelandii* ocorre, principalmente, em condições de alcalinidade. Tem sido encontrada em solos calcários e em amostras de água corrente, ocorrendo tanto em condições temperadas como tropicais (Becking, 1991). *A. chroococcum* também é bastante comum em solos com pH alcalino (acima de 6,5), ocorrendo tanto em solos de clima tropical, como temperado (Becking, 1991).

*Azomonas* spp têm sido encontradas em *habitats* de água corrente. Existe somente um relato na literatura sobre a ocorrência de uma espécie desse gênero em solo (Becking, 1991).

### 1.1.2 - ISOLAMENTO

O meio de cultura mais freqüentemente usado para o isolamento de *Azotobacter* spp. e *Azomonas* spp. é o meio LG (item 7.1). Geralmente usam-se amostras de solo peneirado em tamiz bem fino ou mesmo solo de rizosfera seco ao ar. Cerca de 100mg do solo são espalhados com uma espátula na superfície das placas, contendo o meio LG ou no caso de diluições seriadas das amostras, 0,1ml de cada diluição é espalhado com a alça de Drigalski. As placas são então incubadas a 30 °C e avaliadas durante uma semana.

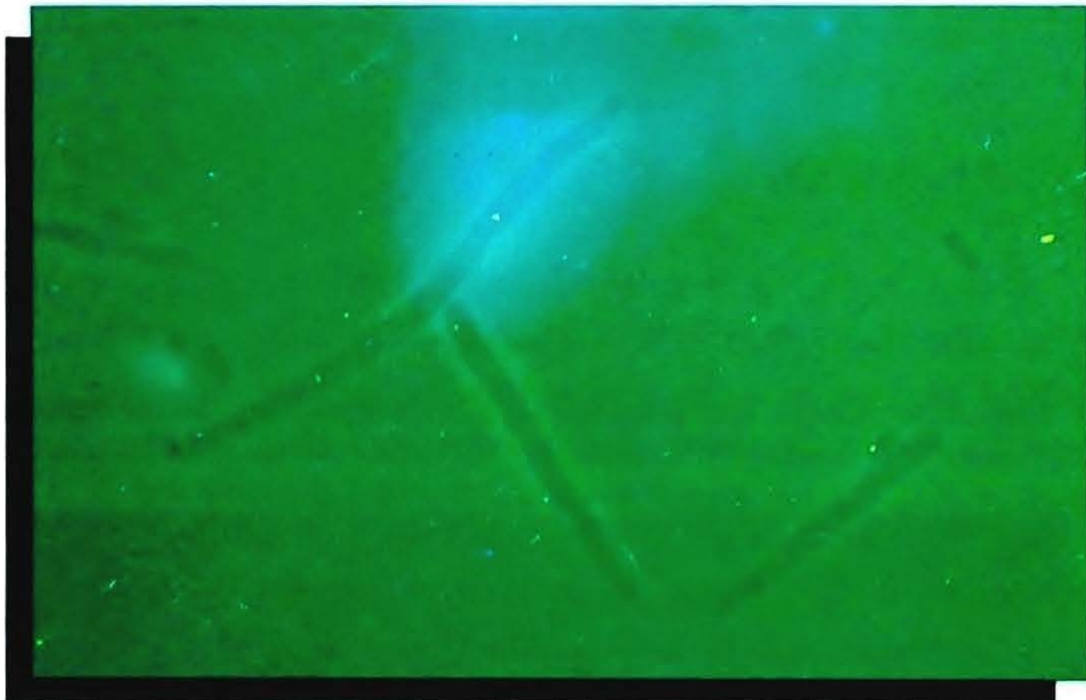
Colônias de *A. chroococcum* aparecem 24 horas após a incubação e se tornam pretas após três a cinco dias. Colônias de *A. vinelandii* e *Azomonas* são semelhantes, mas não se tornam escuras como as colônias de *A. chroococcum*. Já colônias de *Azotobacter paspali* aparecem apenas 48 horas após a incubação e se tornam amareladas em função da assimilação do azul de bromotimol e da acidificação do meio (Fig. 1). A purificação dessas bactérias geralmente é possível após a riscagem das colônias em novo meio LG.



**FIG. 1.** Colônias de bactérias da espécie *Azotobacter paspali* em meio de cultura LG inoculado com amostras de solo de rizosfera de *Paspalum notatum* cv. *batatais*.

### 1.1.3 - CARACTERIZAÇÃO

Células de *A. chroococcum* e *A. vinelandii* são grandes ( $3 \times 5 \mu\text{m}$ ) e ocorrem aos pares, porém são pouco móveis. Células de *A. paspali* são mais móveis, com flagelos peritríqueos e tornam-se longas atingindo 10 a  $15 \mu\text{m}$  de comprimento e  $2 \mu\text{m}$  de largura (Fig. 2). *Azomonas* spp. ocorrem aos pares, individualmente ou em aglomerados e geralmente apresentam pleomorfismo ( $2,0 \mu\text{m}$  ou mais de diâmetro e comprimento variável). Outras diferenças morfológicas e fisiológicas entre espécies desse grupo são apresentadas na Tabela 1.



**FIG. 2.** Células bacterianas da espécie *Azotobacter paspali* vistas ao microscópio óptico.

## 1.2 - BEIJERINCKIA E DERXIA

### 1.2.1 - DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

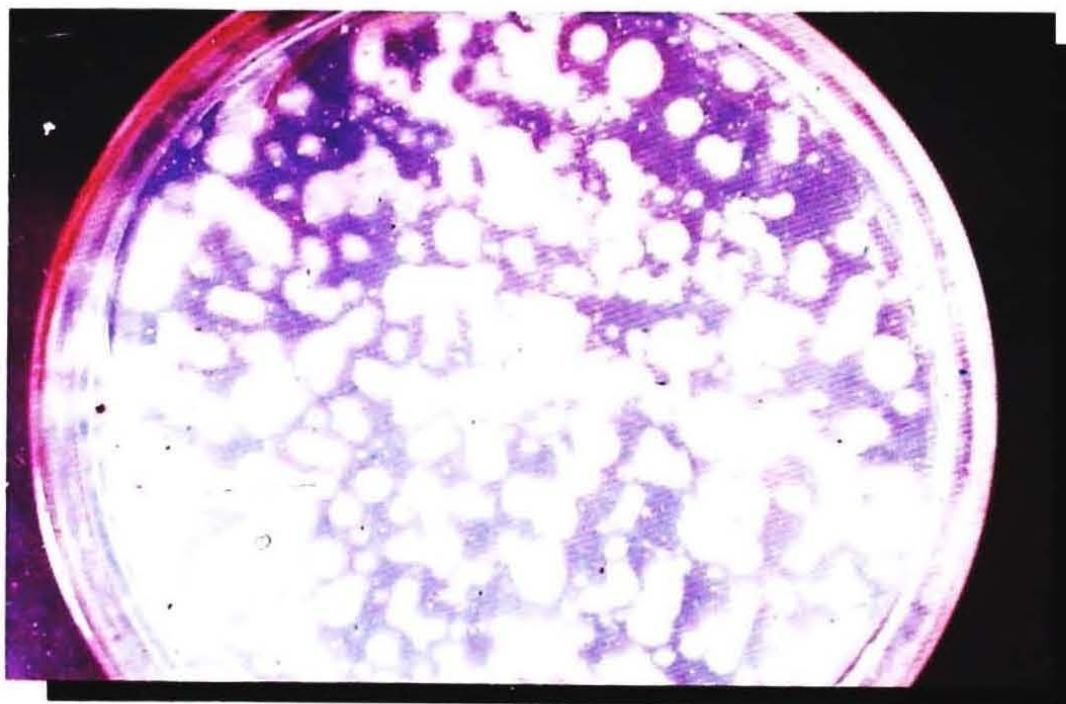
*Beijerinckia* spp. têm sido encontradas em solos de clima tropical (Döbereiner & Ruschel, 1958), subtropical e temperado (Saubert & Grobbelaar, 1962; Araújo, 1970), assim como em regiões polares (Jordan & McNicol, 1978). Apesar de ser muito comum a ocorrência

desse gênero em diversos solos, *Beijerinckia* spp. têm sido encontradas em associação principalmente, com cana-de-açúcar (Döbereiner & Alvahydo, 1959), onde a presença dessa bactéria foi verificada em 95% das amostras de solos coletados, contra somente 62% dos solos sob outras vegetações. Outros estudos da ocorrência dessa bactéria mostraram um aumento de cerca de 20 vezes na rizosfera e de 50 vezes no rizoplano de raízes de plantas de cana-de-açúcar (Döbereiner, 1961).

*Derxia* spp, têm sido isoladas de raízes de arroz e outras plantas em solos geralmente alagados e ricos em matéria orgânica (Campêlo & Döbereiner, 1970), porém nenhuma interação planta/bactéria foi ainda demonstrada. Sua ocorrência parece restrita aos trópicos (Becking, 1991).

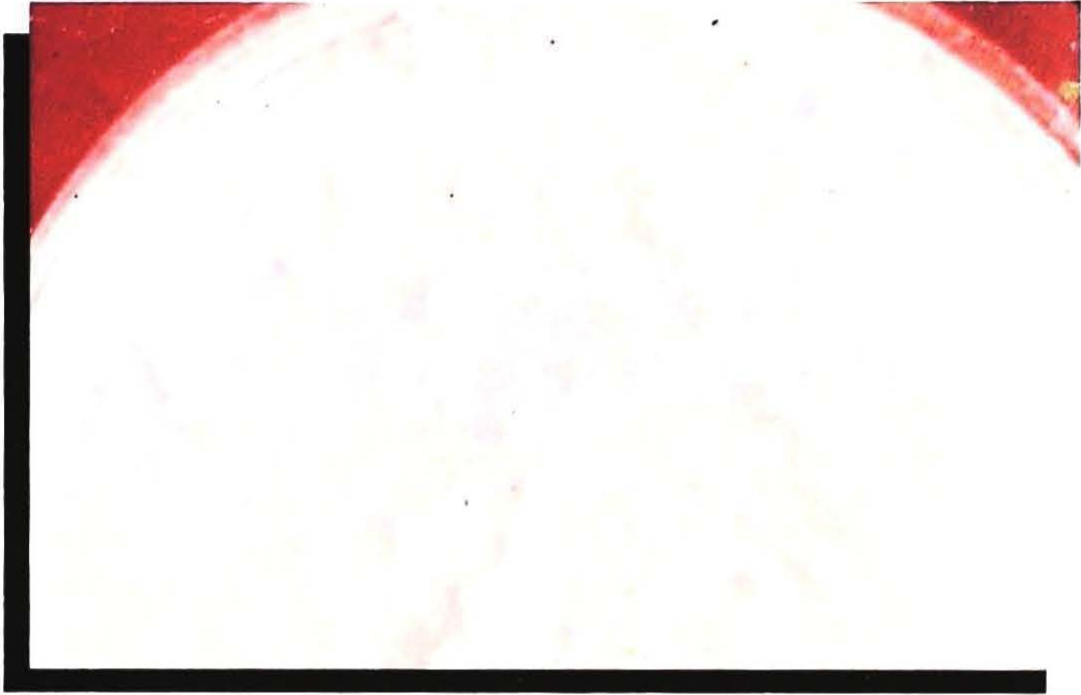
### 1.2.2 - ISOLAMENTO

O isolamento de *Beijerinckia* spp. é feito em placas contendo o meio de Sílica-Gel (item 7.2). Amostras de solo seco ao ar e peneirado em tamiz de malha fina são semeadas sobre as placas (20 a 100mg/placa) que são incubadas por dez dias a 30 °C (Fig. 3).

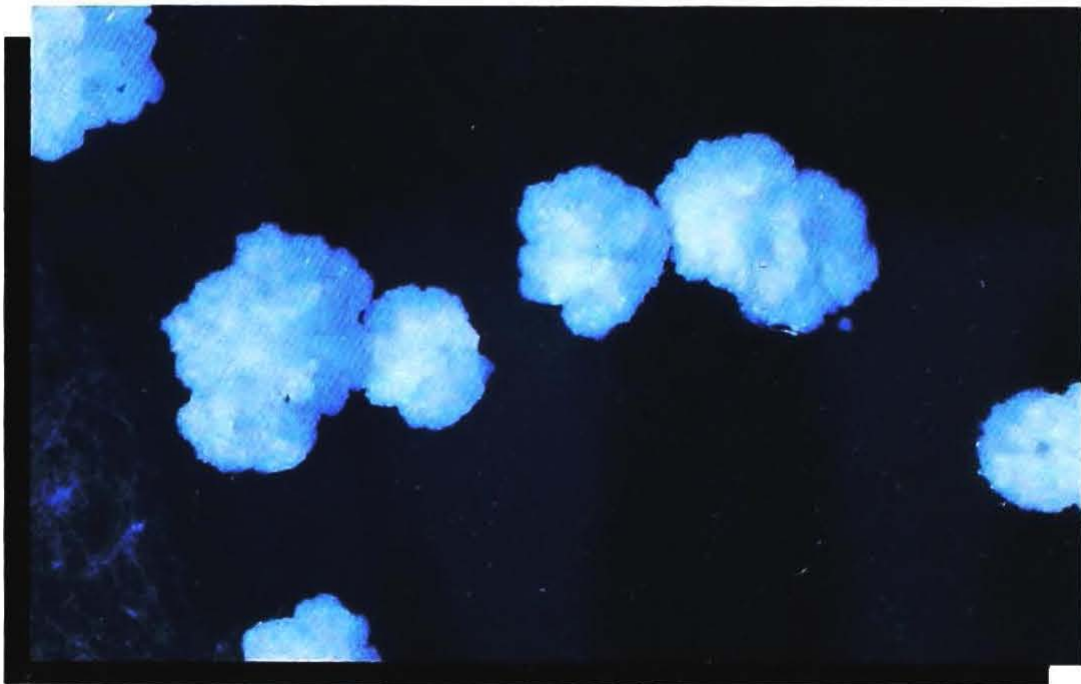


**FIG. 3.** Colônias de bactérias da espécie *Beijerinckia indica* em placa de Sílica-Gel inoculada com amostras de solo da rizosfera de cana-de-açúcar.

*Beijerinckia indica* forma colônias brancas que crescem rapidamente (Fig. 4). Já a *Beijerinckia fluminensis* forma colônias muito menores, secas e que se tornam ligeiramente beges (Fig. 5). Estimativas do número de *Beijerinckia* somente podem ser feitas em microcolônias, já que é difícil separar as células que ocorrem no solo.



**FIG. 4.** Colônias de bactérias da espécie *Beijerinckia fluminensis* em placa de Sílica-Gel inoculada com amostras de solo da rizosfera de cana-de-açúcar.



**FIG. 5.** Colônias isoladas de bactérias da espécie *Beijerinckia fluminensis* em placas de Sílica-Gel.



O isolamento de *Derxia* spp. é feito em meio LGD (item 7.3). Amostras de solo de rizosfera seco ao ar são peneiradas em tamiz de malha fina, espalhadas sobre as placas e incubadas até sete dias. As placas podem ser também inoculadas com pedaços de raízes. Parece que tanto as raízes como as amostras de solo possuem suficiente N para dar origem à formação de colônias capazes de fixar N (Fig. 6). Inicialmente, as colônias são pequenas e brancas, mas após alguns dias, se tornam marrons e começam a crescer demasiadamente devido à formação de cápsulas mucosas, cuja função é proteger a nitrogenase contra o O<sub>2</sub>. *Derxia gummosa* é mais facilmente isolada após a incubação a 35 °C por sete dias. Para purificação final, colônias inteiras são colocadas em água por duas horas, para amolecimento das cápsulas e depois homogeneizadas e riscadas em placas de LGD (item 7.3), onde dois tipos de colônias se formam: 1) colônias pequenas e ligeiramente beges, que não prosseguem o crescimento devido à falta de capacidade de fixar N<sub>2</sub>; 2) colônias grandes de cor marrom, que são capazes de fixar N<sub>2</sub> (Fig. 7). A incubação de placas com colônias pequenas em pO<sub>2</sub> reduzido (0,05% Atm O<sub>2</sub>) permite a fixação de N<sub>2</sub> tornando as colônias grandes e marrons (Campêlo & Döbereiner, 1970). A melhor estimativa do número de *Derxia* presente nas amostras parece ser a avaliação da percentagem de grânulos de solo ou pedacinhos de raízes contendo a bactéria.

### 1.2.3 - CARACTERIZAÇÃO

Células das duas espécies de *Beijerinckia* possuem 1 x 3µm e contêm dois glóbulos refratários de gordura que podem ser identificados pela coloração com **Sudan Black**. Células de *B. fluminense* aparecem empacotadas em envelopes de Zoogléias (Fig. 8).

As células de *Derxia* medem de 3 a 6 x 1 a 1,2µm e ocorrem individualmente ou em pequenos anéis, podendo ocorrer pleomorfismo com a idade e o meio de cultura utilizado. Contêm pequenos grânulos de Poli-Hidroxi-Butirato (PHB). Outras diferenças fisiológicas desse grupo são apresentadas na Tabela 1.

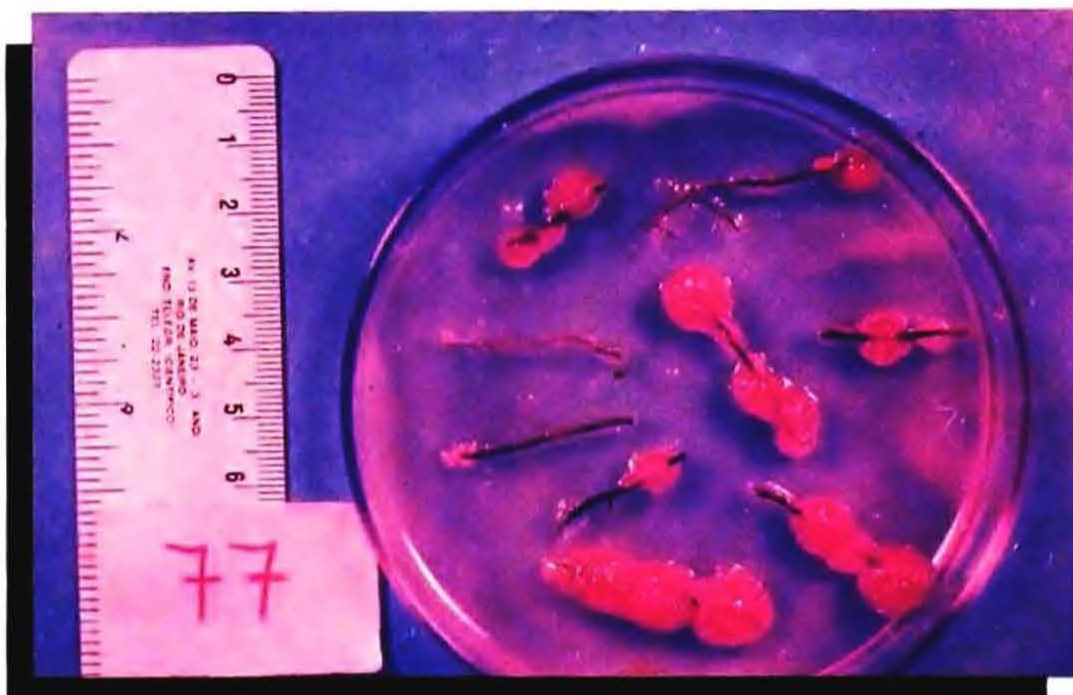


FIG. 6. Colônias de bactérias da espécie *Derxia gummosa* em meio de cultura LGD inoculado com pedaços de raízes de plantas de arroz.



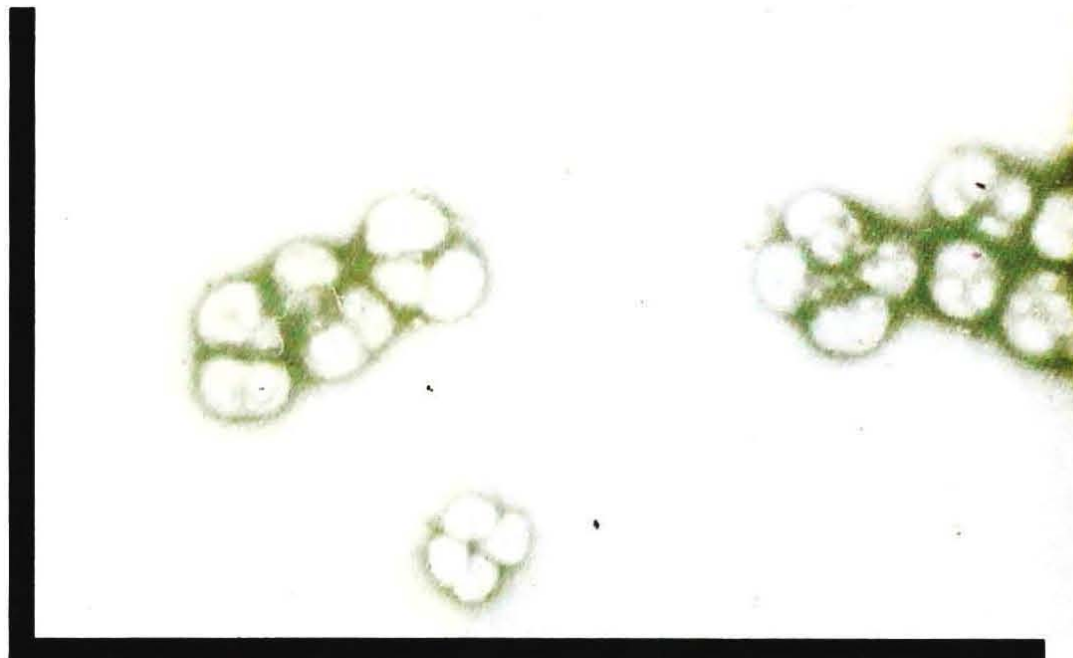
FIG. 7. Colônias de bactérias da espécie *Derxia gummosa* em meio de cultura LGD com e sem N-combinado.

**Tabela 1. Características fisiológicas que diferenciam as bactérias aeróbias fixando N<sub>2</sub> sob ar.**

	<i>Azotobacter</i> spp.	<i>A. paspali</i> <sup>a</sup>	<i>Azomonas</i> spp.	<i>Beijerinckia</i> spp.	<i>Derxia</i> spp.
Célula >1,5x3µm	+	+	+	-	-
Cistos	+	+	-	-	-
Película superficial meio líquido	+	+	+	-	-
Fonte C para FBN:					
amido	-	-	-	-	+
glucose ou frutose	+	+	+	+	+
sacarose	+	+	+	+	-
Produção de ácido de: glucose, sacarose e frutose	-	+	-	+	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	-	+	+/-	-
Temperatura ótima (°C)	25 - 32	30 - 35	25 - 32	25 - 30	25 - 35
pH ótimo	6,5 - 8,0	5,5 - 7,8	6,5 - 7,5	4,5 - 6,0	5,5 - 8,0

<sup>a</sup> esta espécie se associa especificamente com *P. notatum*

+ característica presente; - característica ausente

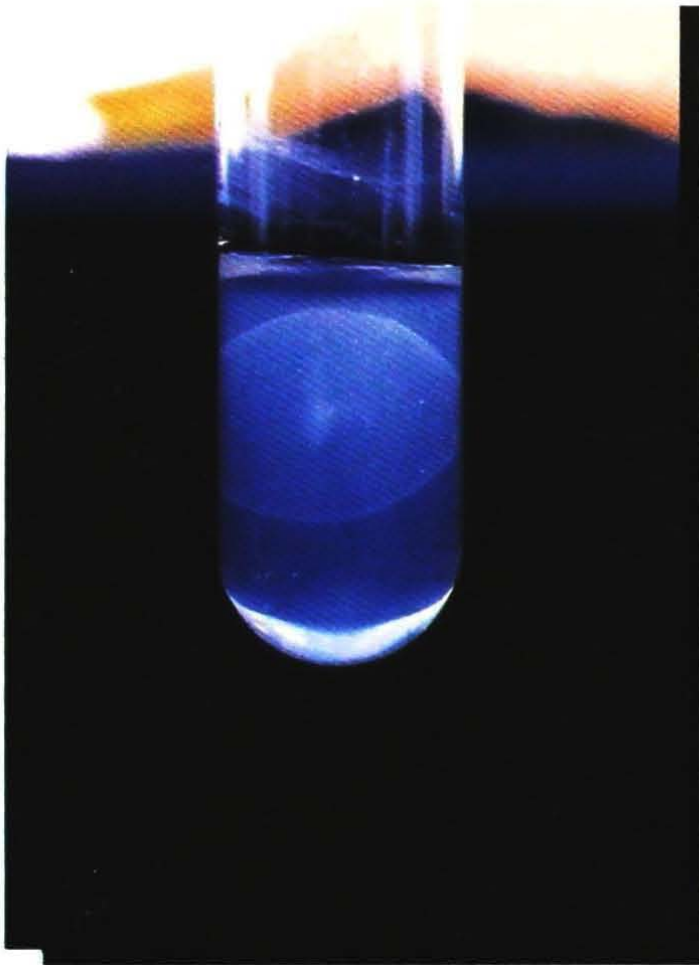


**FIG. 8.** Células bacterianas da espécie *Beijerinckia fluminensis* vistas ao microscópio óptico.

### 1.3 - *AZOSPIRILLUM* SPP

#### 1.3.1 - PRINCÍPIO DA METODOLOGIA

O descobrimento das cinco espécies de *Azospirillum* se deve à introdução de meios Semi-Sólidos sem N<sub>2</sub>, 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. Nessa faixa, formam-se películas em forma de véu (Fig. 9), inicialmente 5 a 10mm abaixo da superfície, movendo-se em direção à superfície, quando as células atingem número suficientemente elevado, para escoar o O<sub>2</sub> excessivo que se acumula em volta das mesmas, ativando assim a nitrogenase (Fig. 10).



**FIG. 9.** Detalhe da formação de véu característico de bactérias do gênero *Azospirillum*, em meio NFb Semi-Sólido.



**FIG. 10.** Detalhe da película característica de bactérias do gênero *Azospirillum* formada em meio NFb Semi-Sólido.

### 1.3.2 - DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

Das cinco espécies de *Azospirillum* atualmente identificadas, as mais estudadas são *A. lipoferum* e *A. brasilense*. Elas ocorrem em grande abundância, principalmente em regiões tropicais, em associação com gramíneas forrageiras (Döbereiner & Day, 1976), milho (Bülow & Döbereiner, 1975), trigo (Baldani et al., 1983), arroz (Baldani, 1984) e sorgo (Pereira et al., 1989). Números na faixa de  $10^6$  células/g raízes e solo, foram encontrados durante o ciclo vegetativo de milho e sorgo cultivados em condições tropicais (Döbereiner, 1978). Valores similares também foram observados em solo e raízes de plantas de clima temperado (Reynders & Vlassak, 1976).

A espécie *A. amazonense* foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras e pupunha nativa da Região Amazônica (Magalhães et al., 1983). Posteriormente, essa bactéria foi encontrada em números bastante similares aos observados para as espécies anteriores, em solo da rizosfera e raízes de arroz, milho e sorgo cultivados na Região Centro-Sul do Brasil (Baldani, 1984).

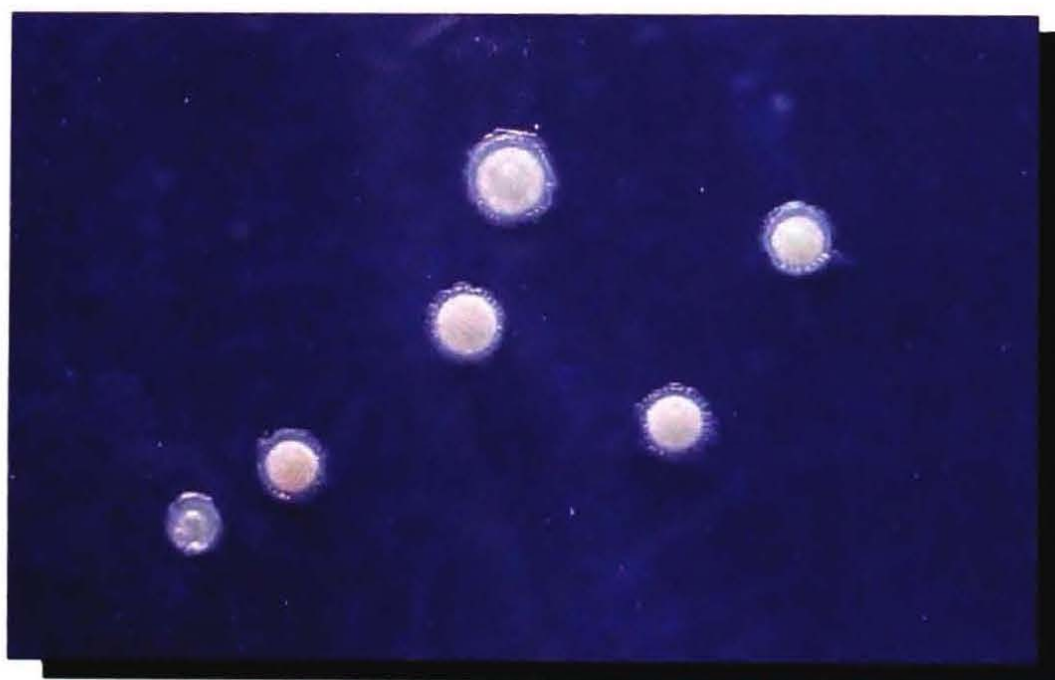
A espécie *A. halopraeferans* foi isolada da gramínea Kallar Grass (*Leptochloa fusca*) crescida em solos salinos do Paquistão (Reinhold et al., 1987). Sua ocorrência parece estar restrita a essa planta, já que tentativas de isolamento dessa espécie em outras plantas de regiões com solos salinos no Brasil não tiveram sucesso (Reinhold et al., 1988).

A espécie *A. irakense* foi inicialmente isolada de plantas de arroz crescidas no Iraque (Khammas et al., 1989). Não há relato da ocorrência dessa bactéria em outras gramíneas e em outros países.

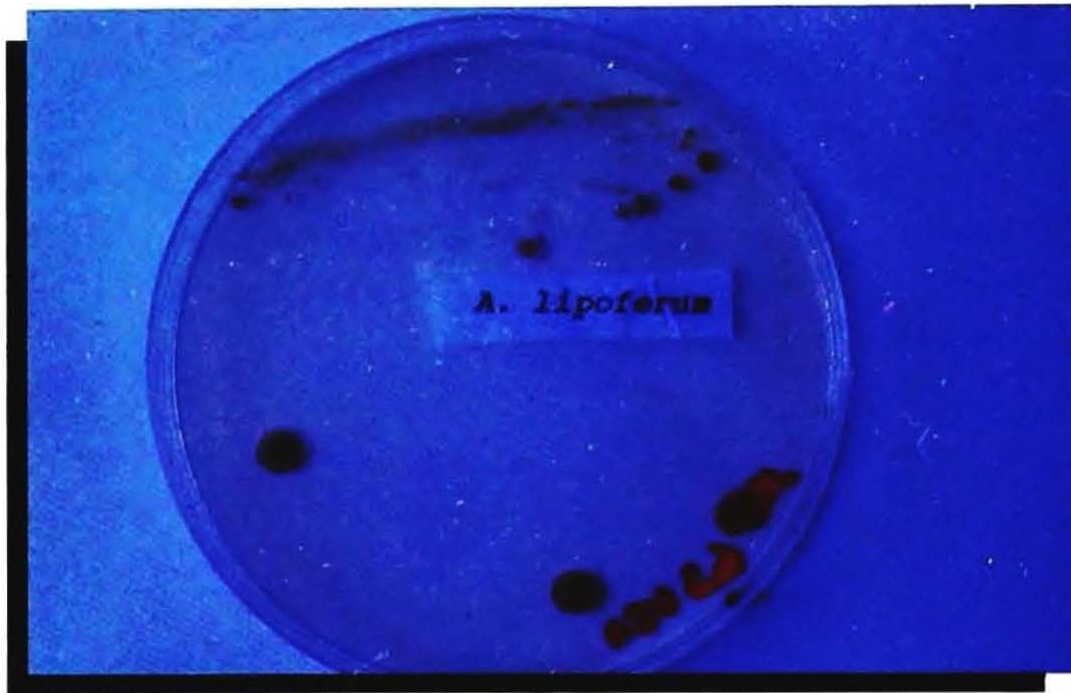
### 1.3.3 - ISOLAMENTO

As espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. irakense* são isoladas em meio NFb Semi-Sólido (item 7.4). A espécie *A. halopraeferans* pode ser isolada em meio NFb modificado pela adição de NaCl e pH alcalino.

Para isolar *A. brasilense* e *A. lipoferum* o meio NFb Semi-Sólido é inoculado com 0,1ml de suspensão de solo ou raízes lavadas ou esterilizadas (ver item 3.1) de plantas e incubado a 35 °C por quatro a sete dias. Quando a película fina atingir a superfície, transfere-se com uma alça de platina uma quantidade da cultura para novo meio NFb Semi-Sólido e incuba-se na mesma temperatura, até que um novo véu seja formado. Nessa fase, as culturas são riscadas em placas contendo meio NFb Sólido (15g agar/litro) acrescido de 20mg de extrato de levedura. Após a incubação por três a cinco dias, colônias dessas duas espécies aparecem pequenas, secas e brancas (Fig. 11). Para purificação final, essas colônias são transferidas para novo meio NFb Semi-Sólido e, após a formação de véu, são riscadas em placas de meio Batata (item 7.5). As colônias formadas nesse meio são, inicialmente, branco-amareladas, tornando-se róseas, pequenas e estruturadas após uma semana de incubação a 35 °C (Fig. 12). Uma colônia de cada placa é novamente repicada para NFb Semi-Sólido para caracterização da espécie (item 1.3.4) e estocagem (item 5).



**FIG. 11.** Colônias isoladas das espécies *Azospirillum lipoferum* em meio de cultura NFb acrescido de extrato de levedura.



**FIG. 12.** Colônias de bactérias da espécie *Azospirillum lipoferum* em meio de cultura Batata.

*A. irakense* é isolada usando-se, basicamente, o mesmo procedimento anterior, sendo que a temperatura de incubação é de 33 °C, em vez de 35 °C. As colônias apresentam-se transparentes, convexas, com margem regular e tamanho de 1mm, após quatro dias em placas com meio NFb.

*A. halopraeferans* também pode ser isolada com o procedimento anterior, sendo que o meio contém 1,5% de NaCl e a temperatura de incubação é de 41 °C.

*A. amazonense* é isolada em meio LGI (item 7.6). Da mesma forma que para as espécies descritas anteriormente, pode-se isolar essa espécie de frascos com meio de cultura LGI Semi-Sólido, inoculados com diluições seriadas de raízes e solo da rizosfera das mais diferentes gramíneas. Películas finas formam-se na superfície do meio LGI Semi-Sólido, cinco a sete dias após a incubação a 32 °C. Estas são então repicadas para novo meio LGI Semi-Sólido e, após o crescimento, riscadas em placas com o mesmo meio LGI, acrescido de 20mg de extrato de levedura e 20g de agar/l. As colônias formadas nesse meio, após cinco dias, são pequenas, brancas e estruturadas (Fig. 13). Estas são outra vez transferidas para novo meio LGI Semi-Sólido e, após a



formação da película, riscadas em placas com meio Batata (item 7.5), onde essa espécie forma colônias grandes (até 5mm) bem distintas, de coloração branca, achatadas e com as bordas elevadas. A forma da colônia pode ser alterada de acordo com a fonte de C e N usada (Fig. 14). Uma colônia de cada placa é novamente repicada em meio LGI Semi-Sólido, para confirmação da espécie (item 1.3.4) e posterior estocagem (item 5).

As espécies de *A. lipoferum* e *A. brasilense* podem também ser crescidas em meio NFb Líquido com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g/l) enquanto o *A. amazonense* cresce muito bem em meio LGI, contendo  $\text{KNO}_3$  (1g/l).



**FIG. 13. Colônias de bactérias da espécie *Azospirillum amazonense* em meio de cultura LGI acrescido de extrato de levedura ou glutamato.**



FIG. 14. Colônias de bactérias da espécie *Azospirillum amazonense* em meio Batata com malato, glucose e mistura de malato e sacarose.

#### 1.3.4 - CARACTERIZAÇÃO

As culturas puras de *A. lipoferum* e *A. brasilense* devem ser repicadas para meio NFb Semi-Sólido e incubadas por 48 horas a 35 °C. As células de *A. brasilense* podem ser identificadas como bastonetes curvos, móveis, com 1 x 3 a 5µm, mesmo após o meio tornar-se alcalino. Células novas de *A. lipoferum* são idênticas, mas quando o meio torna-se alcalino, as células ficam grandes, pleomórficas e imóveis (podendo ter 10µm de comprimento e 3 a 5µm de espessura). As duas espécies também podem ser identificadas pelo crescimento em meio com glucose, onde somente a espécie *A. lipoferum* é capaz de usar a glucose como única fonte de C.

A espécie *A. irakense* é caracterizada pelo crescimento em meio NFb Semi-Sólido com até 0,3% de NaCl e pH alcalino (7,0 a 8,5). Células em meio *Nutrient Broth* podem alcançar o tamanho de 20µm.

*A. halopraeferans* é identificada pelo crescimento em temperatura de 41 °C e tolerância às condições salinas. As células podem alcançar

o tamanho de 1,2µm x 0,7 a 1,4µm de espessura quando o meio torna-se alcalino.

*A. amazonense* é caracterizada pela habilidade de usar sacarose como única fonte de C (algumas estirpes de *A. lipoferum* também crescem em presença de sacarose). As células dessa espécie possuem tamanho de 0,9 x 3 a 4µm em meio LGI.

Outras características fisiológicas e morfológicas que distinguem essas espécies estão resumidas na Tabela 2.

As espécies de *Azospirillum* também podem ser separadas através do uso de sondas de oligonucleotídeos, desenvolvidas para cada espécie (Tabela 3).

**Tabela 2. Características fisiológicas diferenciais de *Azospirillum* spp.**

	<i>A.</i> <i>brasiliense</i>	<i>A.</i> <i>lipoferum</i>	<i>A.</i> <i>amazonense</i>	<i>A.</i> <i>irakense</i>	<i>A.</i> <i>halopraeferans</i>
Células pleomórficas	-	+	±	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+	±	+	+
Fixação de N <sub>2</sub> :					
glucose	-	+	+	+	-
sucrose e maltose	-	-	+	+	-
myo-inositol	-	+	+	-	n.d.
hidrólise de pectina	-	-	-	+	-
Temp. ótima (°C)	32 - 37	32 - 37	32 - 37	30 - 33	41
pH ótimo	6,0 - 7,8	5,7 - 6,8	5,7 - 6,5	6,4 - 6,7	6,8 - 8,0

n.d. não-determinado;  
+ característica presente; - característica ausente.

**Tabela 3. Seqüências derivadas da 23S – rRNA usados para o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos<sup>a</sup>.**

Nome	Seqüência de Nucleotídeo	Temperatura de dissociação (°C)
AA-Oligo	5' - GTG TGC CAT GGA GGT GT-3'	54
AB-Oligo	5' - GCC CGG CTG GGG ACC C-3'	60
AH-Oligo	5' - AGC GTG CTG CGG CGA-3'	52
AL-Oligo	5' - TAG CCC CGC CTT ATA-3'	46
AI-Oligo	5' - CTG AAA ACC AGT ATG C-3'	46
AZO-Oligo	5' - CCC WGG AAA YAG CCC C-3'	52 - 53
HS-Oligo	5' - GTC CCG GTT TTT GCA TCG A-3'	58
HR-Oligo	5' - TAG TCG GTT TTT GCA TCG A-3'	54
AD-Oligo	5' - ATC CGG CTT TTG GCG CA-3'	54

a - Adaptado de Kirchhof & Hartmann (1992) e Hartmann et al. (1993).

---

---

## MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS

### 2.1 - PRINCÍPIO DA METODOLOGIA

Em contraste com as bactérias diazotróficas aeróbias descritas acima, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, são bactérias endofíticas obrigatórias e portanto devem ser isoladas, principalmente de suas plantas hospedeiras. Essa característica, descoberta recentemente, parece ser a chave para explicar a contribuição de fixação de N<sub>2</sub> muito mais eficiente das associações endofíticas, especialmente nos trópicos, do que das associações rizosféricas.

### 2.2 - *HERBASPIRILLUM* SPP

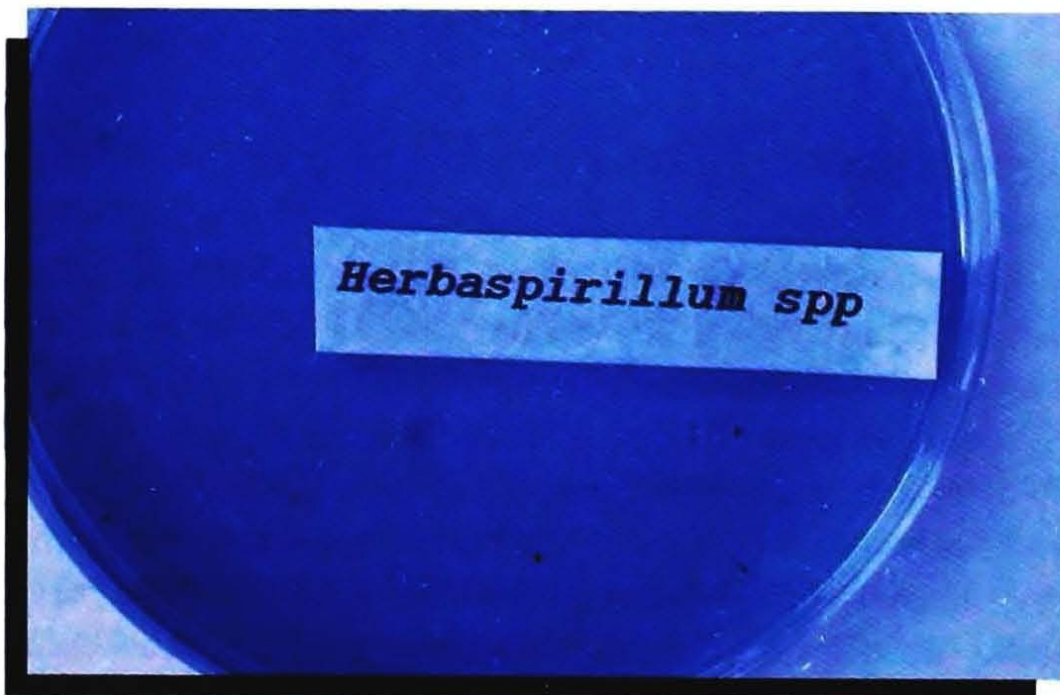
#### 2.2.1 - DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

*H. seropedicae* tem sido isolado de um grande número de amostras de raízes, colmos e folhas de gramíneas, mas não de outras famílias de plantas (Olivares et al., 1993). Não há descrição da ocorrência dessa espécie em outros países, com exceção de um isolado obtido de cana-de-açúcar cultivada no Havaí.

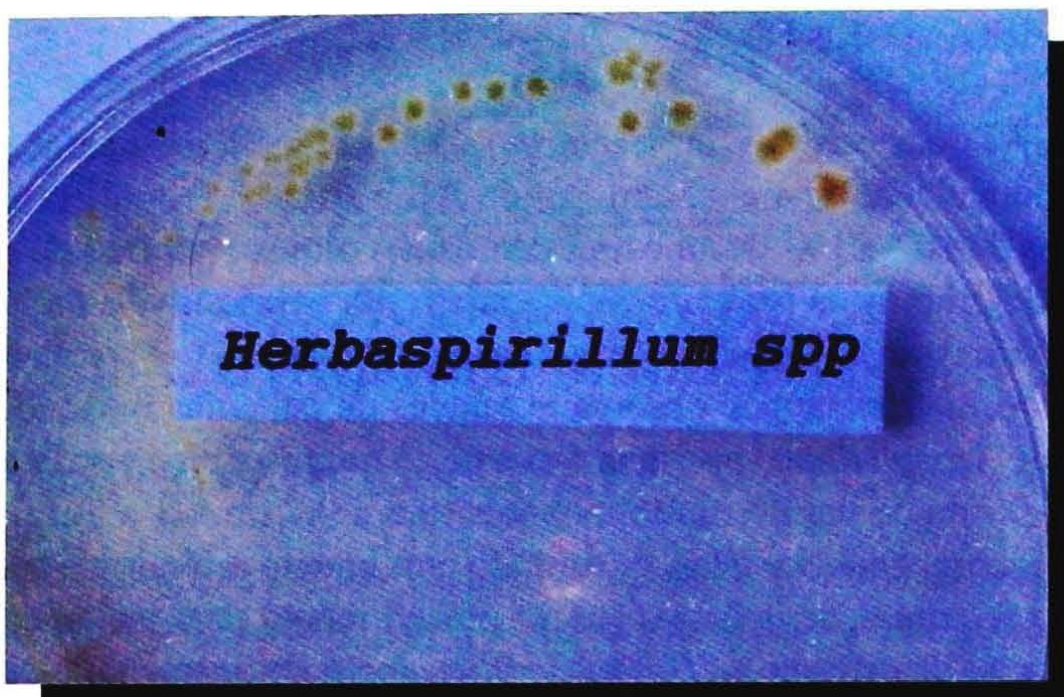
A outra espécie do gênero, *H. rubrisubalbicans*, até então conhecida como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Gillis et al., 1991, Pimentel et al., 1991), é considerada um patógeno que causa a chamada **Estria Mosqueada** em algumas variedades de cana-de-açúcar plantadas nos EUA, mas não nas variedades cultivadas no Brasil. Estudos de sua ocorrência, realizados no Brasil, mostraram que essa espécie só foi isolada de plantas de cana-de-açúcar, mesmo de variedades resistentes a essa doença, onde não há o aparecimento do sintoma.

### 2.2.2 - ISOLAMENTO

As duas espécies de *Herbaspirillum* são melhor isoladas através da inoculação de meio Semi-Sólido JNFb (item 7.7) com diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  de amostras de raízes, colmos ou folhas de cereais ou de gramíneas forrageiras plantadas com baixos níveis de N (*H. seropedicae*) ou de cana-de-açúcar (*H. rubrisubalbicans*). O crescimento de *Herbaspirillum* spp. é observado através de películas finas, idênticas às de *Azospirillum* spp., mas o exame ao microscópico revela células em forma de bastão muito menores ( $0,6$  a  $0,7\mu\text{m}$  x  $3$  a  $5\mu\text{m}$ ), em geral, ligeiramente curvadas, mostrando movimento espiralóide apenas quando próximas de bolhas de ar. O procedimento para isolamento e purificação de estirpes de *Herbaspirillum* spp é praticamente idêntico ao de *Azospirillum* spp. Em placas de meio JNFb, as colônias são pequenas e inicialmente brancas, tornando-se seu centro azulado com uma semana de incubação. Essa característica pode ser mais evidenciada usando-se o meio NFb contendo três vezes a concentração de azul de bromotimol, caso maior (Fig. 15). Em placas de meio Batata, as colônias são úmidas e pequenas, com centro marrom (Fig. 16) e produzem



**FIG. 15.** Colônias de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em meio de cultura NFb contendo três vezes a concentração de azul de bromotimol e acrescido de extrato de levedura.



**FIG. 16.** Colônias de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em meio de cultura Batata.

um cheiro característico. Após a purificação final, as colônias são estocadas de acordo com o item 7. Crescimento em meio líquido pode ser feito em meio JNFb acrescido de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g/l).

### 2.2.3 - CARACTERIZAÇÃO

As duas espécies de *Herbaspirillum* são bastante semelhantes e podem ser diferenciadas através do uso das fontes de C N-acetil-glucosamina e meso-eritritol. A espécie *H. seropedicae* é capaz de usar N-acetil-glucosamina como única fonte de C, sob condições de fixação de N (em meio JNFb Semi-Sólido sem ácido málico), enquanto *H. rubrisubalbicans* usa meso-eritritol somente em meio com N mineral. As duas espécies podem também ser separadas, através do uso de sondas de oligonucleotídeos, desenvolvidas para separar *H. seropedicae* de *H. rubrisubalbicans* (Tabela 3). Outras características morfológicas e fisiológicas do gênero estão na Tabela 4.

## 2.3 - AZOARCUS SPP

### 2.3.1 - DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

Este gênero tem sido encontrado em associação com a gramínea Kallar Grass (*Leptochloa fusca*) que ocorre no Paquistão (Reinhold et al., 1993). Não há, na literatura, nenhum outro relato da ocorrência desse gênero, em associação com outras gramíneas ou em outros países.

### 2.3.2 - ISOLAMENTO

O isolamento das espécies desse gênero pode ser feito em meio NFb Semi-Sólido, usando-se diluições seriadas de amostras de raízes, colmos e folhas, incubadas à temperatura de 37 a 40 °C. As demais etapas do isolamento e purificação são idênticas àquelas para *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. As colônias ficam amareladas no meio NFb. Essas colônias adquirem um amarelo mais intenso, quando o malato (5g/l) do meio NFb é substituído por 5ml/l de etanol.

### 2.3.3 - CARACTERIZAÇÃO

O gênero *Azoarcus* é composto de três espécies denominadas *A. communis*, *A. indigens* e *Azoarcus* sp. As células de *Azoarcus* ocorrem individualmente ou aos pares, com tamanho variado (0,4 a 1,0µm x 1,1 a 4,0µm) e ligeiramente em forma de S. Podem alcançar tamanhos de 8 a 12µm, quando crescidas em meio líquido ou Semi-Sólido, com N (Reinhold et al., 1993). As espécies podem ser diferenciadas através do uso de ácido *p*-amino benzóico (*A. indigens*) e uso de citrato e D-alanina (*A. communis*). A espécie *Azoarcus* sp é constituída de diversas estirpes que não apresentam características em comum e desse modo foram incluídas no gênero, como *Azoarcus* sp. Outras características morfológicas e fisiológicas diferenciais do gênero são apresentadas na Tabela 4.



## 2.4 - *ACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*

### 2.4.1 - DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA

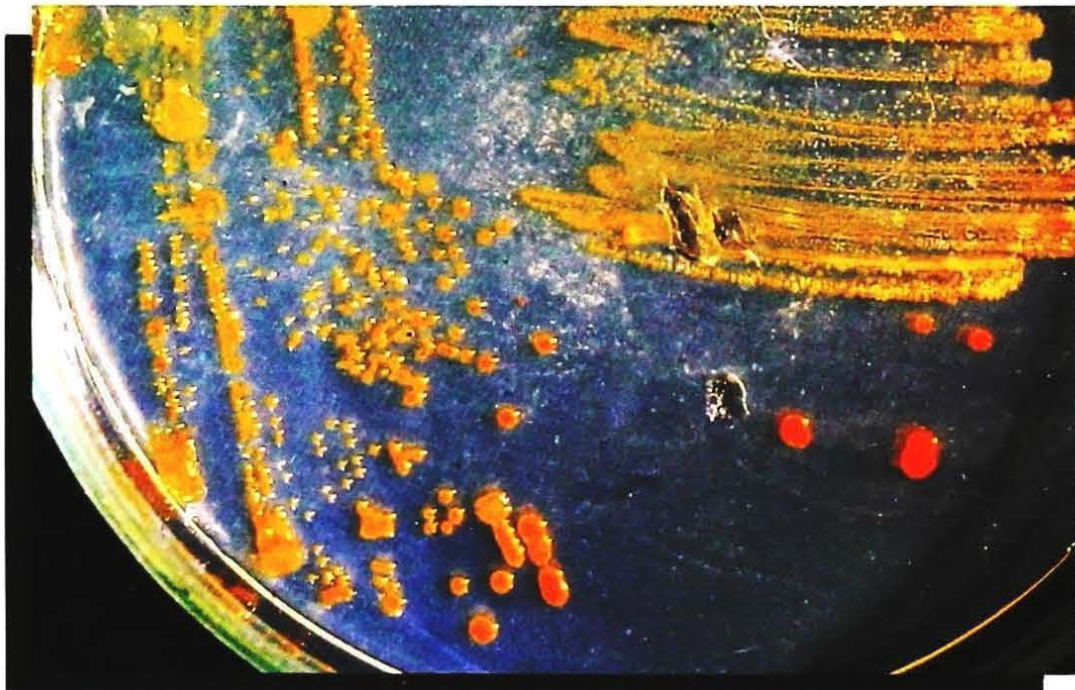
Esta espécie é a única do gênero capaz de fixar  $N_2$ . Sua ocorrência é bastante restrita e tem sido encontrada em associação, principalmente, com plantas que se propagam vegetativamente como a cana-de-açúcar, batata-doce e capim *Cameroon* (Döbereiner, 1992). A grande maioria dos isolados foi obtida de plantas de cana-de-açúcar cultivadas nas diversas regiões do Brasil, embora haja dados sobre sua ocorrência em outros países, tais como, Uruguai, Austrália, Cuba, África do Sul e México (Li & MacRae, 1992; Caballero-Melado & Martinez-Romero, 1994).

### 2.4.2 - ISOLAMENTO

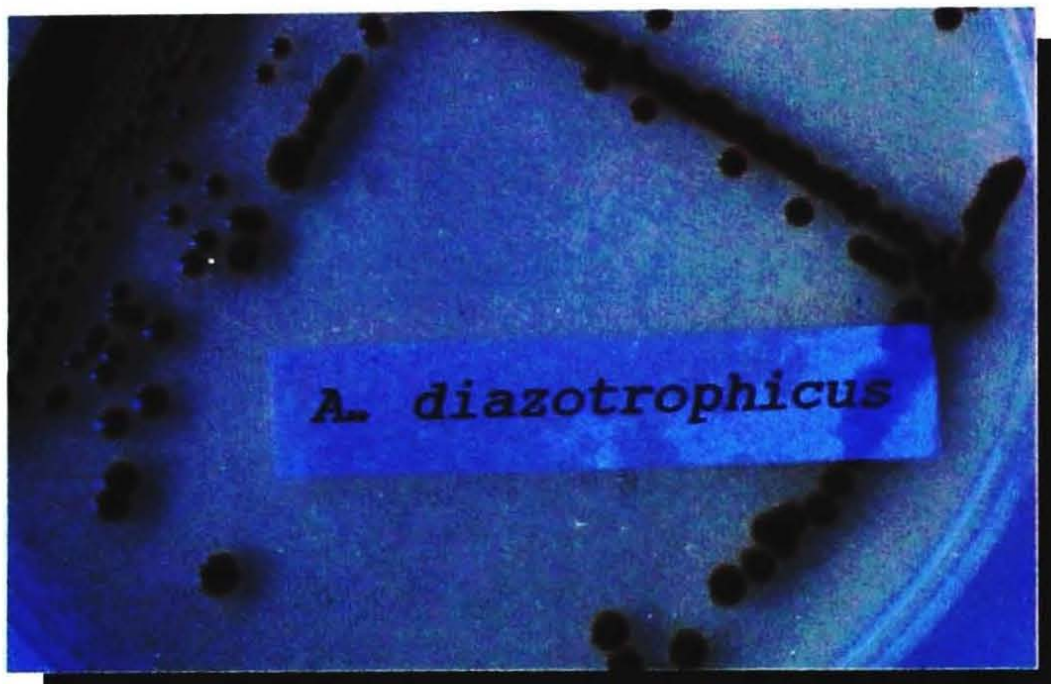
Essa espécie é isolada em meio LGI-P Semi-Sólido, que contém uma alta concentração de sacarose (item 7.8). Alíquotas de diluições seriadas de amostras de raízes, folhas e colmos das plantas testadas são inoculadas no meio LGI-P e incubadas à temperatura de 30 °C. Após sete a dez dias, ocorre a formação de uma película de cor laranja, sendo que o meio abaixo da película fica incolor, devido à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias (Fig. 17). A película é então riscada em placas, contendo o meio LGI-P Sólido, acrescido de 20mg de extrato de levedura que em seguida são incubadas a 30 °C por uma semana. Neste meio, as colônias formadas são pequenas e de cor laranja (Fig. 18). A purificação é feita em meio Batata-P (item 7.9), onde as colônias formadas são inicialmente claras e úmidas, tornando-se de coloração chocolate após sete a dez dias de incubação, a 30 °C (Fig. 19). Da mesma maneira que as demais bactérias mencionadas, colônias individuais são estocadas de acordo com o descrito no item 5. Cultivo em meio líquido pode ser feito em meio LGI ou LGI-P, acrescido de extrato de levedura (100mg/l) ou  $(NH_4)_2SO_4$  (10 mM).



**FIG. 17.** Película característica de bactérias da espécie *Acetobacter diazotrophicus* em meio de cultura Semi-Sólido LGI-P.



**FIG. 18.** Colônias de bactérias da espécie *Acetobacter diazotrophicus* em meio de cultura LGI-P acrescido de extrato de levedura.



**FIG. 19.** Colônias de bactérias da espécie *Acetobacter diazotrophicus* em meio de cultura Batata-P.

### 2.4.3 - CARACTERIZAÇÃO

As células de *A. diazotrophicus* possuem tamanho de 0,7 a 0,8 x 2 a 4 $\mu$ m e não apresentam movimento espiralado. Possuem alta tolerância osmótica e crescem em pH bastante baixo (até pH 3). Essa espécie pode também ser identificada através do uso de sondas de oligonucleotídeos (Tabela 3). Outras características dessa bactéria estão resumidas na Tabela 4.

**Tabela 4. Características fisiológicas diferenciais de bactérias diazotróficas endofíticas.**

	<i>Herbaspirillum</i>		<i>Azoarcus</i>	<i>Acetobacter</i>
	<i>seropedicae</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	spp.	<i>diazotrophicus</i>
Coloração das colônias:				
amarelo em NFb	-	-	+	-
marrom em Batata-P	-	-	-	+
Células vibrióides	+	+	+	-
Película em forma de véu:				
meio Semi-Sólido	+	+	+	-
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+	+	+	-
Atividade de $\text{N}_2$ -ase com $\text{NO}_3^-$	-	-	-	+
Fixação de $\text{N}_2$				
glucose	+	+	-	+
sucrose	-	-	-	+
Fonte de C para crescimento com N mineral:				
N-acetylglucosamine	+	-	-	n.d.
Meso-erythritol	-	+	-	n.d.
Temperatura ótima (°C)	34	30	37-40	30
pH ótimo	5,3 - 8,0	5,3 - 8,0	6,5 - 6,8	4,5 - 5,8

n.d. não-determinado;

+ característica presente; - característica ausente.

# 3

---

---

## PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO

### 3.1- RAÍZES, CAULES E FOLHAS

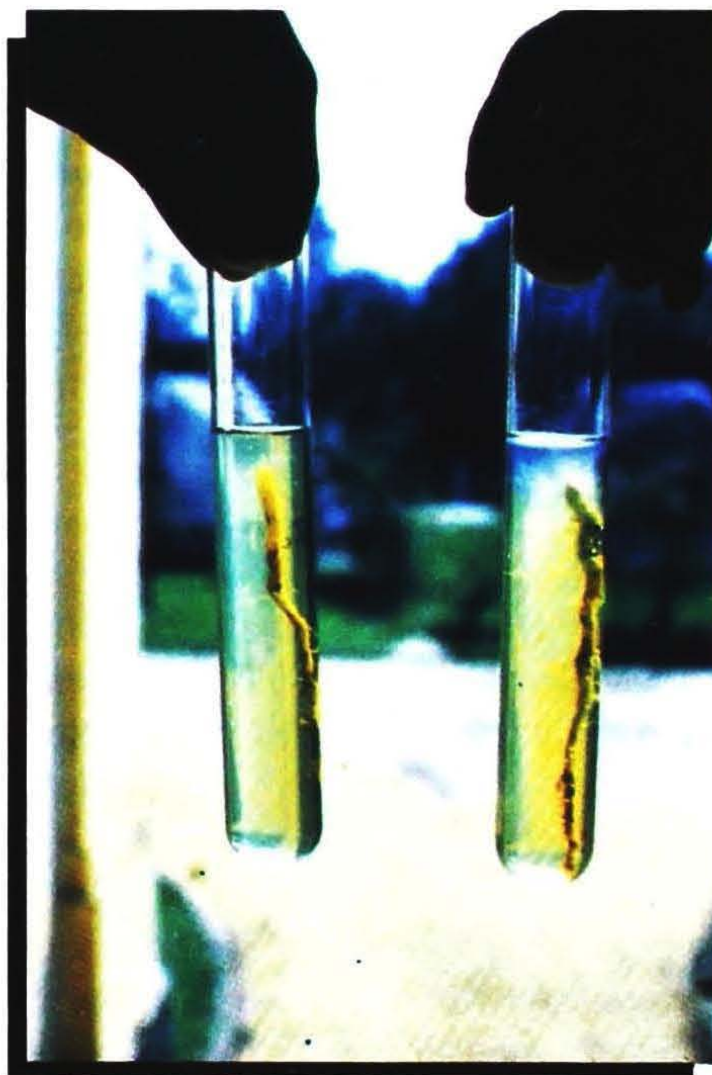
As raízes de plantas coletadas no campo são primeiramente lavadas em água corrente para a retirada completa dos resíduos de solo não liberados pela agitação manual (solo da rizosfera) e cortadas em pedaços de aproximadamente 10cm. Em seguida, são secas em papel-toalha, para a retirada do excesso de água e procede-se a pesagem do material (10g), no caso de se fazer a diluição seriada das amostras.

A esterilização das raízes consiste primeiramente na imersão destas em solução de cloramina-T a 1% ( $C_7H_7ClNNaO_2S_3H_2O$ ). O tempo de esterilização varia de acordo com a idade e o tipo de planta e devem portando ser ajustados. Normalmente, raízes de milho e sorgo na fase de floração são esterilizadas por 30 minutos a uma hora, enquanto arroz e trigo suportam de cinco a quinze minutos de esterilização. As raízes são retiradas da cloramina-T e colocadas em frascos contendo água destilada por dez minutos ou 1/3 do tempo da exposição à cloramina-T. Em seguida, são transferidas para uma solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) e posteriormente lavadas em água destilada. Essas duas últimas etapas terão o mesmo tempo de exposição da etapa anterior, perfazendo-se um total de tempo igual ao de exposição à substância esterilizante. As raízes que não passam pelo processo de esterilização permanecem em água destilada durante o mesmo tempo da esterilização. Um exemplo da eficiência do processo de esterilização de raízes de milho é apresentado na Fig. 20, onde a película característica de *Azospirillum* formou-se somente após o esmagamento das raízes que permaneceram 48 horas em meio NFb Semi-Sólido, com as pontas vedadas com parafina.

As folhas e colmos são lavados em água corrente, secos em papel-toalha e esterilizados superficialmente, através do uso de algodão embebido em álcool.

### 3.2 - SEMENTES

Os métodos de esterilização de sementes são bastante variados e nem sempre se consegue eliminar todas as bactérias presentes. Desse modo, o método utilizado deve ser adequado para cada tipo de semente. Apresentamos dois métodos de esterilização que utilizamos em nosso laboratório, um para arroz e outro para trigo.



**FIG. 20.** Demonstração da eficiência do processo de esterilização de raízes de milho. Pedacos de raízes esterilizados e com as suas pontas vedadas com parafina foram inoculados em meio de cultura NFB Semi-Sólido.

# 4

---

---

## CONTAGEM DE MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

Solo da rizosfera (10g) é normalmente homogeneizado com 90ml de solução salina (item 7.11) ou solução de sacarose ou açúcar cristal a 4%, durante 20 minutos. Raízes lavadas e esterilizadas, colmos e folhas na quantidade de 10g são triturados em liquidificador, com uma das duas soluções (salina ou sacarose) por um a dois minutos. Em seguida, são feitas diluições seriadas das amostras em solução salina ou de sacarose ( $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ).

### 4.1 - Meio Semi-Sólido

A contagem em meio Semi-Sólido é feita através da inoculação de 0,1ml de cada diluição no centro do meio Semi-Sólido específico para o diazotrófico desejado. Não realizar a inoculação na superfície do meio, pois a bactéria que precisa fixar  $N_2$  é sensível ao  $O_2$ , conforme descrito anteriormente. Geralmente faz-se a inoculação de três frascos para cada diluição, embora cinco frascos seja o mais indicado, pois diminui-se o erro de amostragem já que o método usado para quantificar o Número Mais Provável (NMP) é baseado na presença ou ausência da película formada no meio Semi-Sólido, conforme apresentado na Tabela de McCrady (Tabela 5).

### 4.2 - Placas

Em casos de cultura pura, pode-se determinar o número de células presentes na amostra. Para isso, 1ml da cultura é homogeneizado com 9ml de solução salina ou outro veículo (água estéril ou solução de sacarose a 4%) e em seguida é feita a diluição seriada até  $10^{-9}$ , conforme descrito anteriormente. Em alguns casos, pode-se usar 20 a 100 $\mu$ l de solução dispersante, como *Tween 20* ou *80*. Alíquotas de 0,1ml são espalhadas com uma alça de Drigalski na superfície da placa contendo

A esterilização do arroz consiste em imergir cerca de 10g de sementes sem a casca em solução de estreptomicina a 0,1%, contendo duas gotas de detergente comercial e agitar a 100rpm por 20 minutos. Em seguida, lavar duas vezes em água destilada estéril e agitar novamente em solução de  $\text{HgCl}_2$  (0,1%) na proporção de 1:1000 por 20 minutos a 100rpm. Lavar as sementes oito vezes em água destilada estéril, sob agitação, por dez minutos cada. Pré-germinar as sementes em placas de meio Batata (item 7.5) com 1% de agar.

A esterilização de sementes de trigo consiste em imergir as sementes em etanol (95%) por 30 segundos, sob agitação (100rpm). Em seguida, agitar as sementes em solução de hipoclorito acidificado (item 7.10) por cinco minutos. Fazer quatro lavagens sucessivas de um minuto cada, em água estéril. Imergir as sementes por quatro horas em água estéril. Colocar novamente as sementes em solução de hipoclorito acidificado por cinco minutos e fazer três lavagens sucessivas de um minuto em água estéril. Deixar cinco minutos em peróxido de hidrogênio (100 volumes) e novamente lavar quatro vezes em água estéril por um minuto cada, sob agitação. Imergir as sementes por quatro horas em água estéril e colocar para germinar em placas de agar/água ou meio Batata, com 1% de agar.



o meio desejado. No caso de meio específico, este deve conter uma fonte de N. Normalmente, adicionam-se 20mg de extrato de levedura/l. Quando um meio rico é usado (Batata, Batata-P, etc), não é necessário adicionar fonte nitrogenada. A determinação do número de células é feita, multiplicando-se o número de colônias presentes na diluição (contar placas contendo entre 40 a 200 colônias) pelo fator de diluição correspondente e pelo volume da amostra (no caso de 0,1ml, corresponde ao fator 10). Exemplo: 60 colônias formadas na placa inoculada com 0,1ml da suspensão da diluição  $10^{-7}$ . O número de células/ml será igual a  $60 \times 10^7 \times 10 = 6,0 \times 10^9$ .

**Tabela 5. Tabela de McCrady para cálculo do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com três e cinco frascos/diluição.**

A - 3 tubos/diluição					
Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,4	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

(Continua)

**Tabela 5. Continuação**

B - 5 tubos/diluição

Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	410	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0

**Tabela 5. Continuação**

B - 5 tubos/diluição

Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

Exemplo para o cálculo do NMP com três frascos/diluição:

1. diluição  $10^{-5}$  — três frascos positivos (formação de película);2. diluição  $10^{-6}$  — dois frascos positivos (formação de película);3. diluição  $10^{-7}$  — um frasco positivo (formação de película).

Entrar na tabela com o número 321 correspondente às diluições positivas e verificar que o número de diazotróficos é igual a 15,0. Multiplicar pelo valor correspondente à diluição  $10^5$  e pelo fator 10 (usamos 0,1ml na inoculação).

Número Mais Provável ( $n^{\circ}$  células/ml) =  $15,0 \times 10^5 \times 10 = 1,5 \times 10^7$

# 5

---

---

## MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

### 5.1- MEIO DE CULTURA INCLINADO

A maneira mais simples e barata para preservar essas bactérias é no próprio meio de isolamento ou em meio Batata. Pode-se usar tubo contendo meio Inclinado, para facilitar a inoculação com a alça, embora o tubo contendo meio sem ser Inclinado (plano) também possa ser usado. Após a inoculação da estirpe e crescimento por dois a três dias, pode-se vedar diretamente o frasco com uma tampa de borracha ou adicionar 2 a 3ml de óleo mineral estéril, glicerol ou glicerina líquida na superfície e fechar com rolha de algodão ou de borracha. Devem ser feitas várias repetições, já que o frasco, ao ser aberto, provoca a morte da bactéria. Isso é mais comum quando as culturas são guardadas sem nenhuma proteção na superfície do meio e não há uma completa vedação da tampa do tubo. *A. amazonense* deve ser estocada em meio com sacarose, porque a elevação do pH acima de 6,5 provoca a morte da bactéria em poucos dias. *A. lipoferum* é relativamente sensível ao pH alcalino. Da mesma forma, o *A. diazotrophicus* não sobrevive por muito tempo em meio Batata-P.

### 5.2- LIOFILIZADO

A liofilização desses microorganismos é feita a partir de culturas crescidas em meio Inclinado por 48 a 72 horas a 30 °C. Os meios de cultura utilizados são aqueles usados para o isolamento das espécies, a menos que a fonte de C varie de acordo com a espécie a ser liofilizada. *A. brasilense* é crescida em meio com ácido málico, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum* spp. em meio com glucose e *A. amazonense* em meio com sacarose. *Acetobacter diazotrophicus* é crescida em meio

F (item 7.12). Culturas crescidas em tubos inclinados são ressuspendidas em 3ml da solução de liofilização (item 7.13) e alíquotas de 0,2ml são distribuídas em ampolas de liofilização que são desidratadas de acordo com o procedimento recomendado para as espécies de *Rhizobium* (Vincent, 1970).

### 5.3 - GLICEROL E NITROGÊNIO LÍQUIDO

As espécies de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *A. diazotrophicus* podem ser estocadas em glicerol 50%. Para tanto, as células são crescidas no meio específico de cada espécie, até alcançar o final da fase logarítmica, misturadas na proporção de 1:1 com glicerol estéril e transferidas para tubos tipo *Eppendorf*. Em seguida, são colocadas no *freezer* a -20 até -70 °C.

Essas bactérias podem também ser estocadas por muitos anos em N líquido, porém não é prático, considerando-se o número muito alto de culturas que existe numa coleção.

---

---

## REQUISITOS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

Dada a grande diversidade da microflora dos solos tropicais, não há dúvida da existência de um alto número de bactérias diazotróficas ainda desconhecidas. Frequentemente, durante o processo de isolamento de bactérias diazotróficas em meio Semi-Sólido, nos deparamos com bactérias diferentes, que devido à alta frequência de ocorrência, fazemos crer que constituem uma nova espécie ou mesmo novo gênero. Entretanto, nem sempre isto é verdadeiro e portanto deve-se tomar certos cuidados antes que qualquer estudo taxonômico seja iniciado. Transcrevemos, em seguida, uma lista contendo algumas recomendações que podem auxiliar na definição de nova bactéria fixadora de N, de acordo com Döbereiner (1989):

1. O pesquisador deve ter bastante experiência com o maior número possível de diazotróficos, para iniciar a identificação de uma nova bactéria fixadora de N;
2. Iniciar o trabalho com, no mínimo, dez isolados obtidos de diferentes origens e que sejam fenotípica e morfológicamente semelhantes ao microscópio, mas distintos de outras espécies já conhecidas;
3. Crescer as culturas dez vezes em meio rico, através de repicagens sucessivas e reconfirmar a sua capacidade de fixar N<sub>2</sub> através da inoculação em meio Semi-Sólido;
4. Na avaliação da diversidade fenotípica, diferentes meios de cultura, contendo indicadores (ex. azul de bromotimol), devem ser usados para mostrar os diversos hábitos de crescimento;

5. As culturas devem ser observadas diariamente e o comportamento de crescimento anotado;
6. Devem ser feitas lâminas que, examinadas ao microscópio, dêem sempre uma idéia da morfologia e mobilidade da bactéria, nas diferentes fases de crescimento;
7. O meio de enriquecimento deve, sempre que possível, ser livre de N, e a suspeita de que é um novo diazotrófico deve ser aceita quando a atividade de nitrogenase for superior a 50 nmoles/h/cultura;
8. O meio de enriquecimento e isolamento deve ser sempre adaptado às condições de onde a bactéria foi isolada;
9. Os isolados devem ser testados várias vezes em diferentes meios e, uma vez confirmada a capacidade de fixar N, devem ser comparados com estirpes-padrão de espécies similares;
10. *Kits* disponíveis no mercado, principalmente para *Enterobacteriaceae*, nem sempre indicam a espécie correta e devem ser sempre acompanhados por testes, usando-se fontes de C adicionadas no meio inicialmente desenvolvido;
11. Uma vez identificada como nova espécie, esta deve ser confirmada através de análise taxonômica, baseada na homologia de DNA:DNA, DNA:rRNA ou seqüenciamento da molécula 16S rRNA.

---

---

## MEIOS DE CULTURAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

### 7.1 - MEIO DE CULTURA LG (*Azotobacter* spp. e *Azomonas* spp.)

O meio LG foi desenvolvido por Lipman (1904) e sua composição (por litro) é a seguinte:

20,00g	sacarose ou açúcar cristal
0,05g	$K_2HPO_4$
0,15g	$KH_2PO_4$
0,02g	$CaCl_2$
0,20g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,002g	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
0,01g	$FeCl_3 \cdot 2H_2O$
5ml	azul de bromotimol (sol. 0,5% em etanol)
1,00g	$CaCO_3$

Completar para 1000ml, com água destilada. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH e adicionar 15g de agar.

### 7.2 - MEIO DE SÍLICA-GEL (*Beijerinckia* spp.)

Este meio foi desenvolvido por Winogradsky (1932) e requer certos cuidados na sua preparação.

**Soluções:** A: HCl diluído para  $d = 1.100$

B:  $Na_2O_5 \cdot SiO_2$  (*water glass*) diluído para  $d = 1.1060$



Sais de Winogradsky:

5,0g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
2,5g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2,5g	$\text{NaCl}$
0,005g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,05g	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,05g	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$

Ajustar o pH da solução para 6,5 e completar o volume para 1000ml com água destilada.

**Preparo das placas:** misturar 500ml da **Solução B** com 500ml da **Solução A** sob constante agitação e imediatamente distribuir nas placas de *Petri* (30ml). Deixar de 24 a 48 horas em repouso para solidificar e em seguida colocar em água corrente por três dias, até que o teste de  $\text{AgNO}_3$  para determinar a presença de clorina seja negativo (não haja formação de precipitado branco após a adição de uma gota de solução a 1% de  $\text{AgNO}_3$  na superfície da placa). Uma vez completada essa etapa, as placas podem ser guardadas em vasilhames fechados durante vários meses. Para o seu uso, as placas são esterilizadas em água destilada fervente, para eliminar possíveis resíduos de cloro. Essas placas, livres de cloro, recebem, na sua superfície, 2ml da solução de Winogradsky, contendo glucose na concentração de 10%, previamente aquecida até a fervura. Em seguida, as placas são colocadas para secar em forno limpo a 80 °C.

### 7.3 - MEIO DE CULTURA LGD (*Dexia* spp.)

O meio LGD é o meio LG (Lipman, 1904) modificado por Campêlo & Döbereiner (1970) e sua composição, por litro, é a seguinte:

20,00g	glucose ou amido
0,05g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
0,15g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,01g	CaCl <sub>2</sub>
0,20g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,002g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,01g	FeCl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O
2ml	azul de bromotimol (sol. 0,5% em etanol)
0,01g	NaHCO <sub>3</sub>

Completar para 1000ml com água destilada. Ajustar o pH para 7,0 e adicionar 15g de agar.

#### 7.4 - MEIO DE CULTURA NFb (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans*)

Este meio foi inicialmente denominado Fb, referente às iniciais do pesquisador **Fábio Pedrosa**, que o desenvolveu. Com a sua modificação, o mesmo passou a chamar-se NFb, onde a consoante **N** significa **Novo**. A composição do meio é a seguinte (por litro):

5,0g	ácido málico
0,5g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,1g	NaCl
0,02g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
2ml	solução micronutrientes <sup>a</sup>
2ml	azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4ml	FeEDTA (solução 1,64%)
1ml	solução de vitaminas <sup>b</sup>
4,5g	KOH

Ajustar o pH para 6,5 ou 6,8 com NaOH e completar o volume para 1000ml com água destilada. Colocar as substâncias na ordem indicada.

Para o meio Semi-Sólido, adicionam-se 1,75 a 1,8g de agar/l e para o meio Sólido adicionam-se 15g de agar/l.

**A - solução de micronutrientes:**

0,04g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
1,20g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
1,40g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
1,00g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
1,175g	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O

Completar o volume para 1000ml com água destilada.

**B - solução de vitaminas:**

10mg	biotina
20mg	piridoxol-HCl

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100ml com água destilada. Manter a solução em geladeira.

**7.5 - MEIO DE CULTURA BATATA (Purificação de *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp.)**

200g	batata
2,5g	ácido málico
2,5g	açúcar cristal
2ml	solução de micronutrientes (ver meio NFb)
1ml	solução de vitaminas (ver meio NFb)

**Modo de preparar:** pesar 200g de batata inglesa, descascar, lavar e ferver durante 30 minutos. Em seguida, filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades de ácido málico e açúcar cristal dissolvendo-as em água destilada, até 50ml e ajustando o pH para 6,5 a 7,0 com KOH. Adicionar ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar o volume para 1000ml, com água destilada.

## 7.6 - MEIO DE CULTURA LGI (*A. amazonense*)

O meio LGI foi desenvolvido a partir do meio LG (Lipman, 1904). A consoante **I** refere-se ao nome do pesquisador **J. Ivo Baldani**, que promoveu o ajuste do meio para o isolamento do *A. amazonense*. A sua composição é a seguinte (por litro):

5g	sacarose ou açúcar cristal
0,2g	$K_2HPO_4$
0,6g	$KH_2PO_4$
0,2g	$MgSO_4 \cdot 2H_2O$
0,02g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0,002g	$Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$
5ml	azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
4ml	FeEDTA (solução 1,64%)
1ml	solução de vitaminas (ver meio NFb)

Ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com  $H_2SO_4$  e completar o volume para 1000ml com água destilada. Para meio Semi-Sólido, adicionar 1,75g de agar/l e para o meio Sólido 15g de agar/l.

## 7.7 - MEIO DE CULTURA JNFb (*Herbaspirillum* spp)

O meio JNFb foi desenvolvido a partir do meio NFb e a consoante **J** refere-se ao nome da pesquisadora **Johanna Döbereiner**. A composição do meio (por litro) é a seguinte:

5,0g	ácido málico
0,6g	$K_2HPO_4$
1,8g	$KH_2PO_4$
0,2g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,1g	NaCl
0,02g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
2ml	solução de micronutrientes (ver sol. meio NFb)
2ml	azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
4ml	FeEDTA (solução 1,64%)
1ml	solução de vitaminas (ver meio NFb)
4,5g	KOH

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000ml, com água destilada. Adicionar 1,8 e 17g de agar/l para meio Semi-Sólido e Sólido, respectivamente.

#### 7.8 - MEIO DE CULTURA LGI-P (*A. diazotrophicus*)

Este meio foi desenvolvido a partir do meio LGI (Baldani, 1984) e a consoante **P** significa **Pernambuco**, local do isolamento da primeira estirpe de *Acetobacter diazotrophicus*. Sua composição (por litro) é a seguinte:

100g	sacarose ou açúcar cristal
0,2g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,6g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2g	MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,02g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,002g	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
5ml	azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
0,01g	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O

Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético e completar o volume para 1000ml com água destilada. Adicionar 1,8 ou 17g de agar/l, para meio Semi-Sólido e Sólido, respectivamente.

#### 7.9 - MEIO DE CULTURA BATATA-P (Purificação de *A. diazotrophicus*)

Este meio é preparado da mesma forma que o meio Batata descrito no item 7.5, onde o ácido málico é substituído por 100g de açúcar cristal/l.

#### 7.10 - SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO ACIDIFICADO

**Solução A:** NaOCl a 5% v/v

**Solução B:** 160ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40ml de HCl concentrado e 250ml de água destilada estéril

**Solução C:** *Tween 80* a 1% v/v

Misturar 20ml da **Solução A**, 4ml da **Solução B** e 2ml da **Solução C**. Completar o volume para 200ml com água destilada.

#### 7.11 - SOLUÇÃO SALINA PARA DILUIÇÃO

3,4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
0,1g  $\text{NaCl}$   
0,02g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
2ml solução de micronutrientes (ver meio NFb)  
4ml  $\text{FeEDTA}$  (solução 1,64%)  
4,5g  $\text{KOH}$

Ajustar o pH para 7,0 com  $\text{KOH}$  e completar o volume para 1000ml com água destilada.

#### 7.12 - MEIO F

10,0g extrato de levedura  
20,0g  $\text{CaCO}_3$   
50,0g glucose  
3,0ml de azul de bromotimol

Completar o volume para 1000ml com água destilada.

#### 7.13 - SOLUÇÃO DE LIOFILIZAÇÃO

10g sacarose  
5g peptona

Completar o volume para 100ml com água destilada.



## BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, S.C. de. Ocorrência de bactérias do gênero *Beijerinckia* em solos do Município de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Boletim: Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas**, Curitiba, v.13, p.71-76, 1970.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924-929, 1983.
- BALDANI, J.I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Itaguaí: UFRRJ, 1984. 110p. Tese de Mestrado.
- BECKING, J.H. The genus *Beijerinckia*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H. (Ed.). **The prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1991. p.2254-2267.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.15, p.25-32, 1983.
- BÜLLOW, J.F.W. von; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v.72, p.2389-2393, 1975.
- CABALLERO-MELADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugar cane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1532-1537, 1994.



- CAMPÊLO, A.B.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Dervia* sp. em solos de alguns estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.5, p.327-332, 1970.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p.357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, Berlin, v.124, n.3, p.224-230, 1970.
- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H., (Ed.). **The Prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.2236-2253.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I., (Ed.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1989. p.103-108.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: ISOTOPES in biological dinitrogen fixation; Proceedings of an Advisory group meeting. Vienna: IAEA, 1978. p.51-69.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.15, n.3, p.211-216, 1961.
- DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.

- DÖBEREINER, J.; CAMPELO, A.B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, Special volume, p.457-470, 1971.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J.N. (Ed.). Proceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington: Pullman, Washington State University of Press, 1976. p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v.1, p.261-272, 1958.
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF Group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.293-298. And **Plant and Soil**, v.137, n.1, 1991.
- HARTMANN, A.; ASSMUS, B.; LAURENCE, J.; REIS, V.M.; KIRCHHOF, G. Development and application of 23S-rRNA-direct oligonucleotide probes for *Azospirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 6., 1993, Ismailia, Egito, **Proceedings**. Ismailia: [s.n.], 1993.
- JORDAN, D.C.; McNICOL, P.J. Identification of *Beijerinckia* in the high arctic (Devon Island, Northwest Territories). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, n.1, p.204-205, 1978.

- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. Development of Gene-probes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, p.27-35, 1992.
- LI, R.; MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.5, p.413-419, 1992.
- LIPMAN, J.G. Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of the members of the *Azotobacter* group. **Report of the New Jersey State Agricultural Experiment Station**, v.25, p.237-289, 1904.
- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.55, n.4, p.417-430, 1983.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M.; BUENO, F.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracaju. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.313, 1993. Suplemento. Resumo.
- PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I., (Ed.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1989. p.219-224. And **Plant and Soil**, v.10, p.269-274, 1988.

- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. In: POLSINELLI, M., MATERASSI, R.; VINCENZINI, M.; (Ed.). **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.225-229.(Developments in Plant and Soil Sciences, 48). And **Plant and Soil**, v.137, n.1, p.61-65, 1991.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERTSERS, K.; THIELEMANS, D.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organisms associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.]. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Temperature and salt tolerance of *Azospirillum* spp. from salt-affected soils in Brazil. In: KLINGMÜLLER, W., (Ed.). Berlin: Springer Verlag, p.234-241, 1988.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.3, p.574-584, 1993.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Nitrogen fixing *Spirillum* species in Belgian soils. **Agricultura**, Piracicaba, v.24, p.329-336, 1976.
- SAUBERT, S.; GROBBELAAR, N. The identification and nitrogen fixation of some free-living micro-organisms from the Northern Transvaal. **South African Journal Agricultural**, Pretorie, v.5, n.2, p.283-292, 1962.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

WINOGRADSKY, S. Étude sur la Microbiologie du sol. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v.48, 1932.



Impressão: EMBRAPA - SPI.