HEBERT HERNÁN SOTO GONZÁLES

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Saccharum* sp. (CANA-DE-AÇÚCAR)
CULTIVADAS SOB ADUBAÇÃO ORGÂNICA OU FERTILIZANTE
NITROGENADO OU SEM ADUBAÇÃO**

**Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.**

Área de concentração: Biotecnologia

**Orientadora: Profa. Dra. Heloiza Ramos
Barbosa**

São Paulo

2008

RESUMO

GONZALES, H. S. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum* sp. (cana-de-açúcar) cultivadas sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado ou sem adubação.** 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de SP, São Paulo, 2008.

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas brasileiras realizadas no Brasil, desempenhando importante papel na economia do país. Além disso, a característica de crescimento em solos com baixas concentrações de adubação nitrogenada, é uma planta muito adequada para o estudo de fixação biológica do nitrogênio.

Bactérias endofíticas são aquelas que habitam o interior de tecidos vegetais, sem que se verifique dano aos mesmos. Devido aos poucos dados existentes a respeito de suas funções tais bactérias despertam especial interesse por seu grande potencial biotecnológico. A elas são atribuídas funções importantes como contribuição na nutrição vegetal, a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal e controle de fitopatógenos.

A diversidade de endófitos em cana-de-açúcar tem focado também a característica diazotrófica nessas bactérias, relacionada ao aspecto nutricional da planta.

No presente estudo, a diversidade bacteriana endofítica fixadora de nitrogênio foi pesquisada utilizando métodos microbiológicos e moleculares. Isolaram-se microrganismos de raiz, caule e folha de cana-de-açúcar. A preocupação com o meio ambiente também é objetivo deste trabalho, pois, nele pretende-se avaliar o impacto de um tipo de adubação alternativa, a adubação orgânica, sobre esta microbiota. Para efeito de comparação também são analisadas a microbiota isolada, respectivamente, de cana-de-açúcar submetida a adubação convencional e sem adubação.

Análises por seqüenciamento do 16S rDNA identificaram 150 endófitos. No total, foram identificados 18 gêneros. Destes, apenas 4 estavam presentes em cana-de-açúcar submetida aos 3 tratamentos. A maior diversidade de gêneros foi encontrada em cana sob adubação orgânica: 10 gêneros, em cana sob adubação inorgânica foram 11 gêneros e 8 em cana sem adubação. A maior parte dos gêneros pertence à família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella* (24 isolados no total), *Pantoea* (21) e *Enterobacter* (18). Raros foram os gêneros *Acidovorax*, *Dyella*, *Agrobacterium* e *Azoarcus* foram isolados uma única vez de apenas um dos tipos de tratamento de cana)

O gene *nifH* foi detectado em 89% dos gêneros bacterianos sendo 78%, 95% e 94% respectivamente em cana-de-açúcar sob adubação orgânica, inorgânica e sem adubação.

Algumas características fisiológicas foram determinadas nos isolados. A enzima endoglicanase foi produzida por 82% dos isolados oriundos de cana sob adubação orgânica.

Atividades mais baixas foram encontradas em bactérias provenientes de adubação inorgânica e sem adubação, respectivamente 54% e 48%. Quanto à atividade de pectinase: 42%, 60% e 36% foram apresentadas por isolados provenientes de cana orgânica, inorgânica e sem adubação, respectivamente. A capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos foi detectada em 76,6% dos isolados, sendo a maior capacidade de solubilização de fosfatos encontrada em bactérias isoladas de cana-de-açúcar sob adubação orgânica (71%), de cana submetida a adubação convencional (78%) e pelas bactérias provenientes da cana-de-açúcar sem adubação (88%). Muito baixa atividade antifúngica foi encontrada nos isolados em geral.

Foram realizados estudos de colonização em plântulas de cana-de-açúcar com quatro isolados geneticamente modificados (EGMs) capazes de expressar os genes fluorescentes GFP e DsRed. A avaliação da colonização na cana-de-açúcar foi realizada utilizando-se a técnica de microscopia de fluorescência, a qual mostrou que os endófitos expressando *gfp* e *dsred* colonizaram as raízes e caules das plantas inoculadas, sem causar qualquer sintoma de doença. Após a colonização as EGMs foram reisoladas das plantas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Bactérias endofíticas, *nifH*, GFP, DsRed, Microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

GONZALES, S.H **Characterization of endophytic, nitrogen-fixing bacteria isolated from *Saccharum* sp. (sugarcane) cultivated under organic fertilization or nitrogenated fertilization and no fertilization.** 2008. 146 f. Thesis (Doutorado em Biotecnologia) – Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de SP, São Paulo, 2008.

One of the most important cultures in Brazilian agriculture is sugarcane that represents an important role in the country's economy. Due to its characteristic growth in soils under low concentration of nitrogenated fertilization, it is an adequate plant to study biological nitrogen fixation.

Endophytic bacteria live inside vegetable tissues, without causing damage to them. Since there are few data available related to their functions, these bacteria draw special attention due to its biotechnological potential. Important roles are attributed to these bacteria such as contributions to plant nutrition, production of plant growth promoting substances and phytopatogens control.

The diversity of sugarcane endophytic bacteria has been frequently focused the diazotrofism in these bacteria, related to their contribution to plant nutrition.

In the present study, endophytic bacterial diversity has been searched using both microbiologic and molecular methods. Microorganisms were isolated from sugarcane root, shoot and leaf. Concern about the environment is another goal of this work, since it aims to evaluate the impact of one kind of alternative fertilization, the organic one, on this microbiota. The microbiota isolated from sugarcane submitted to conventional fertilization and without fertilization will be compared.

150 isolates were identified by 16S rDNA sequencing. 18 genera were found and only 4 were present in sugarcane submitted to the three treatments. The greatest genera diversity was found in sugarcane submitted to organic fertilization: 10 genera in sugarcane submitted to inorganic fertilization were found 11 genera and 8 genera in sugarcane without fertilization. Great part of the found genera belongs to the Enterobacteriaceae family: *Klebsiella* (24), *Pantoea* (21) and *Enterobacter* (18). *Acidovorax*, *Serratia*, *Dyella*, *Agrobacterium* and *Azoarcus* were isolated once.

NifH gene was detected in 89% of the bacterial genera, respectively 78%, 95% and 94% in sugarcane submitted to organic fertilization, inorganic fertilization and no fertilization.

Some physiological characteristics were determined in the isolates. Endoglucanase was produced by 82% of the isolates from sugarcane submitted to organic fertilization. Lower activities were found in bacteria isolated from inorganic fertilization and no fertilization, respectively 54% and 48%.

As far as pectinase activity is concerned, a percentage of 42%, 60% and 36% was presented by the isolates from organic fertilization, inorganic fertilization and no fertilization, respectively. The ability of phosphate solubilization was detected in 76.6% of the isolates. In sugarcane under organic fertilization a percentage of 71% was found, in bacteria from inorganic fertilization, 78%, and without fertilization, 88%. A very low mycological activity was found in the isolates in general.

Plant colonization was determined using sugarcane plantlets inoculated with four genetically modified bacteria (GMEs), able to express the fluorescent genes GFP and DsRed. The colonization was evaluated by fluorescence microscopy, which showed that the endophytic bacteria expressing *gfp* and *dsred* genes had invaded roots and shoots from inoculated plants, without causing any disease symptom. After colonization, the (GMEs) were re-isolated.

Key Words: Sugarcane, Endophytic bacteria, *nifH*, GFP, DsRed, Fluorescence Microscopy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Elemento nitrogênio

Com exceção da água, o nitrogênio é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO e DÖBEREINER, 1994). Depois do carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio é um dos nutrientes mais abundantes na matéria viva, participando da composição de moléculas de ácidos nucleicos e proteínas entre outras. Na atmosfera, apresenta-se em grandes quantidades, como elemento quimicamente muito estável, não assimilável pela maioria dos seres vivos, requerendo sua transformação para uma forma combinada que possibilite sua assimilação.

O aumento da população humana em meados do século 20 foi mantido por alimentos submetidos a fertilizantes nitrogenados obtidos pelo processo de Haber-Bosch. Este processo combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como uréia, sendo necessárias cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de nitrogênio em altas pressões (35 a 100 Mpa) e temperatura (300 a 400° C). Estes requisitos são responsáveis pelo excessivo consumo de combustível e elevados custos. Como cerca de 77×10^6 toneladas de nitrogênio são aplicadas globalmente na forma de fertilizante, o requerimento de combustível fóssil é cerca de 10^8 toneladas por ano, correspondendo a aproximadamente 1,4 % de todo o combustível de origem fóssil consumido. A Revolução Verde aumentou grandemente a produção de cereais, mas foi utilizada associada a doses elevadas deste tipo de adubação inorgânica. Vários problemas surgiram como consequência destas aplicações: a contaminação da água e de alimentos por NO_3^- e NO_2^- , a toxicidade para as plantas pela presença de altos níveis de NO_2^- nos solos e a emissão de CO_2 contribuindo para o aquecimento global (BOHLOOL et al., 1992; DÖBEREINER, 1992; SPRENT e SPRENT, 1990).

Considerando que a atmosfera terrestre é composta de 78% de gás dinitrogênio, a assimilação de N_2 , via fixação biológica de nitrogênio (FBN), no circuito dos ciclos biogeoquímicos tem efeitos positivos no ambiente e na economia (STACEY et al., 1992). A contribuição de nitrogênio fixado biologicamente que varia de 139 a 170×10^6 toneladas de nitrogênio por ano, pelo menos o dobro da fixação química (PEOPLES e CRASWELL, 1992).

1.2 A cana-de-açúcar e fixação biológica de nitrogênio

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas, cultivada em regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do globo terrestre. Como as variedades brasileiras de cana-de-açúcar foram selecionadas sob condições de baixa fertilidade do solo, necessitam de doses baixas de adubos nitrogenados (AZEREDO et al., 1986) mostrando-se, assim, vantajosas para se estudar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Estudos de quantificação da FBN, em associações de bactérias diazotróficas endofíticas com plantas, mostraram que na variedade CB 47-89 ocorreu um acúmulo equivalente a mais de 150 kg ha⁻¹ de N e em CB 45-3 e SP70-1143 foi observada uma contribuição de 170 a 210 kg ha⁻¹ de N, com valores entre 60% e 70% de nitrogênio incorporado à planta, derivado do processo da FBN (URQUIAGA et al., 1992). Entretanto, a contribuição da FBN é muito diferente entre as variedades (YONEYAMA et al., 1997).

1.3 A microbiota endofítica da cana-de-açúcar

A planta de cana-de-açúcar apresenta elevada eficiência fisiológica na utilização de nitrogênio (SILVEIRA, 1989), absorvendo prontamente o nitrato e convertendo-o, em contato com carboidratos, em amidas e aminoácidos (FERNANDES e ROSSIELLO, 1995). Em estudos sobre o efeito da adubação nitrogenada, AZEREDO et al., (1986) verificaram que somente em 20%, de 135 experimentos de campo conduzidos no Brasil, foram observados efeitos positivos que incrementaram a produção. Os valores de nitrogênio e de açúcar variam com a idade da cana, em razão inversa: na fase inicial da cultura prevalece o primeiro, enquanto o segundo é incrementado com o desenvolvimento (CLEMENTS, 1980).

A associação entre bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar envolve mecanismos singulares, ainda pouco compreendidos (JAMES, 2000). Apenas alguns gêneros bacterianos endofíticos foram isolados e apenas alguns deles foram estudados: *Herbaspirillum* sp (JAMES et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002), *Enterobacter* sp (MAYEUX, 1960; RENNIE et al., 1982), *Erwinia* sp (RENNIE et al., 1982), *Burkholderia* sp (REIS et al., 2004), *Klebsiella* sp (RENNIE et al., 1982) e as espécies de *Pantoea agglomerans* (LOIRET et al., 2004), *Bacillus polymixa* (RENNIE et al., 1982) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PERIN et al., 2004).

1.4 Adubação orgânica

O conceito de agroecologia e agricultura sustentável consolidaram-se na Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento Eco-92, quando foram lançadas as bases para um desenvolvimento sustentável no planeta. Nos dias de hoje, o termo é entendido como um conjunto de princípios e técnicas que visam reduzir a dependência de energia externa e o impacto ambiental da atividade agrícola, produzindo alimentos mais saudáveis e valorizando o homem do campo, sua família, seu trabalho e sua cultura. A agroecologia também é definida como a produção ou cultivo de alimentos de forma natural, sem a utilização de agrotóxicos e adubos químicos solúveis.

Hoje, a maior parte das unidades produtoras de açúcar e de álcool ainda utiliza a adubação mineral, como fonte de nutrientes, na cultura canavieira. Porém, segundo ANJOS, et al., (2007) já é notória a preocupação em se obter um novo produto, de maior valor agregado, por algumas unidades que utilizam o sistema de adubação orgânica ou quase totalmente orgânica.

Matsuoka et al., (2002) afirmam que a produção de cana-de-açúcar orgânica é viável, pois são alcançadas produtividades agrícolas similares às obtidas com adubação mineral. O açúcar produzido organicamente, seja do tipo cristalizado obtido em usinas, seja do tipo mascavo oriundo de empresas de médio porte ou de pequenas empresas familiares, tem tido uma grande aceitação (DELGADO, 1999). É viável a substituição da adubação química pela orgânica sem perdas na qualidade da matéria-prima e nos rendimentos da cultura de cana-de-açúcar (CARVALHO et al., 2006).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta perene pertencente ao gênero *Saccharum*, da tribo Andropogoneae, família Poaceae. É uma cultura que produz, em curto período, um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética (COSTA et al., 2001).

3.1.1 Importância econômica

Mais do que elemento essencial da formação do Brasil, a cana-de-açúcar transformou-se em parte integrante do imaginário do povo brasileiro. Na cozinha, desdobra-se em utilidades; na indústria, colabora para a produção de alimentos mais saudáveis, de fácil conservação. Dela vem o álcool combustível e a energia elétrica produzidas de forma natural, limpa e energia renovável (CONAB, 2006). Também dela podem ser produzidos papel e plásticos biodegradáveis (FAPESP, 2007). A cana-de-açúcar é versátil, palavra que, aliás, justificaria mais um hífen: cana-de-açúcar-versátil, pois apresenta potencial variado e complexo que ainda pode ser muito explorado. No Brasil, em menos de 1% das terras agricultáveis plantam-se 6,2 milhões de hectares de canaviais. Dos 91 milhões de hectares de terras agricultáveis, somente 22 milhões de hectares de terras são propícias ao plantio da cana. (MURILLO, 2007).

A cana-de-açúcar é, em si mesma, usina de enorme eficiência: cada tonelada tem um potencial energético equivalente ao de 1,2 barril de petróleo (UNICA, 2004). O Brasil é o maior produtor do mundo, seguido pela Índia e Austrália. Na média, 55% da cana-de-açúcar brasileira é utilizada para a produção de álcool e 45%, de açúcar. Planta-se cana-de-açúcar no Brasil, no Centro-Sul e no Norte-Nordeste, o que permite dois períodos de safra.

A cana-de-açúcar é a força por trás das 307 “centrais energéticas” existentes no Brasil, 128 das quais estão em São Paulo, utilizando cana-de-açúcar que cobre 2,35 milhões de hectares de terra. São usinas e destilarias que processam a biomassa proveniente da cana-de-açúcar e que alimentam um círculo virtuoso: produzem açúcar

como alimento, energia elétrica vinda da queima do bagaço nas caldeiras, álcool hidratado para movimentar veículos e álcool anidro para melhorar o desempenho energético e ambiental da gasolina (UNICA, 2004).

3.2 Microrganismos endofíticos

Os microorganismos endofíticos podem ser classificados como todos aqueles que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal, sem causar aparentemente nenhum dano ao hospedeiro (PETRINI, 1991). Numa definição mais ampla, endófitos podem ser considerados microrganismos isolados do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente, e que não causam, aparentemente, danos às plantas (HALLMANN et al., 1997). Portanto, eles diferenciam-se dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Até agora, nenhuma das numerosas interações planta-microrganismo está completamente compreendida. Sabe-se que para interagirem com as plantas, diferentes microrganismos, com propósitos distintos, muitas vezes utilizam os mesmos mecanismos (BARON e ZAMBRYSKI, 1995).

3.3 Interação planta-microrganismo

Interações entre plantas e microrganismos têm causado grande efeito no desenvolvimento das civilizações desde que a humanidade começou a depender extensivamente de culturas para alimentação e subsistência. Diversos microrganismos interagem com os tecidos e células das plantas com diferentes graus de dependência, podendo desenvolver interações benéficas (simbióticas ou não) (WELLER, 1988; KLOEPPER et al., 1991; SMITH, 1992) ou patogênicas (STACEY et al., 1992; SMITH e READ, 1996). Entre as interações planta-microrganismo benéficas que têm sido estudadas em detalhes, estão aquelas onde as bactérias dos gêneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* estabelecem simbiose com as plantas da família leguminosa formando nódulos exclusivamente nas raízes (STACEY et al., 1992; SMITH et al., 1996). Nessas relações sabe-se que os microrganismos fornecem nutrientes nitrogenados às plantas. A planta, por sua vez, contribui com nutrientes energéticos gerados pelo processo fotossintético (GLENN et al., 1985). Outras espécies de bactérias diazotróficas têm sido encontradas

dentro dos tecidos de gramíneas e algumas dessas plantas, como certas variedades de cana-de-açúcar, podem obter uma percentagem substancial dos seus requerimentos de nitrogênio a partir do dinitrogênio fixado pela bactéria (BODDEY, 1995). *Herbaspirillum* é um dos gêneros bacterianos capazes de colonizar tecidos de diversas gramíneas de interesse econômico, dentre elas arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (BALDANI et al., 1996) e cana (RONCATO et al., 2003; JAMES et al., 2002). Este microrganismo foi isolado do interior de raízes, caules e folhas (OLIVARES et al., 1996). A colonização de gramíneas por *Herbaspirillum* sp ocorre através da adesão da bactéria à superfície da planta, seguida de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos. Uma vez no interior da planta, os microrganismos podem espalhar-se e alcançar os tecidos aéreos, provavelmente via vasos do xilema (HUREK et al., 1998; JAMES e OLIVARES, 1998). Igualmente, bactérias do gênero *Klebsiella* e *Azospirillum* podem colonizar uma grande variedade de plantas (KOVTONOVYCH et al., 1999).

3.4 Potencialidades das bactérias endofíticas

3.4.1 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação do nitrogênio pode ser realizada por processos industriais (NEWTON, 1996) que contribuem com 25% do total de nitrogênio fixado e por processos físicos como relâmpagos, combustão e vulcanismo, cuja contribuição com o total de nitrogênio fixado é de 10%. Porém a maior contribuição está na fixação biológica de nitrogênio, responsável por 65% do total de nitrogênio fixado anualmente.

A diazotrofia, habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio é uma característica exclusiva de Bactéria e Archaea (SAWADA et al., 2003). A vantagem da fixação biológica sobre a produção industrial de fertilizante torna-se evidente se um parâmetro como a energia for colocada em questão, pois na produção industrial há um consumo de 2% da energia mundial para a produção de fertilizantes (BRITISH PETROLEUM, 1996).

No caso de simbiose a utilização do nitrogênio atmosférico (N_2) envolve a integração entre o processo da fixação e da rota assimilatória do nitrogênio combinado

(N). Assim, a bactéria reduz o N_2 a NH_4^+ que, por sua vez é transformada pela planta em produto orgânico aminado. Para sustentar o crescimento adequado dos dois organismos, o N_2 precisa ser fixado eficientemente e deve envolver mecanismos regulatórios para orientar o fluxo e o intercâmbio de metabólitos entre a planta e o microssimbionte (CULLIMORE e BENNETT, 1992).

As bactérias denominadas rizóbios são consideradas o principal grupo de diazotróficos, por apresentarem um eficiente mecanismo de trocas com a planta o que acarreta em grande importância agrônômica. O segundo grupo economicamente mais importante é composto pelas cianobactérias, que têm sido encontradas como fixadoras de vida-livre e em associações com várias plantas, dentre estas, a planta aquática *Azolla*. O manejo desta espécie vegetal vem sendo estimulado junto ao sistema de arroz irrigado no continente Asiático (DIMIJIAN, 2000). Cianobactérias podem formar ainda associações com vários outros organismos, como fungos e algas (formando líquens) e angiospermas do gênero *Gunnera*. Um terceiro grupo de organismos fixadores de N_2 é representado pela associação simbiótica entre actinomicetos (*Frankia*, *Nostoc*) e plantas de várias famílias, principalmente plantas arbóreas pertencentes aos gêneros *Alnus* e *Casuarina* (RIVAS, 2002).

Outro grupo de diazotróficos apresenta uma associação com plantas menos estudada, não caracterizando uma interação simbiótica. Este grupo inclui bactérias endofíticas que colonizam o interior de plantas superiores. O quinto grupo de bactérias que contribui para o balanço de N nos ecossistemas é constituído por bactérias de vida-livre. Organismos como *Beijerinckia*, e *Azotobacter* sp. vivem no solo ou na superfície de raízes mucosas onde fixam nitrogênio. Esta grande diversidade de espécies de procariotos diazotróficos demonstra a necessidade de estudos de novos microrganismos.

3.4.1.1 Nitrogenase

Desde 1975, BURNS e HARDY já haviam proposto que, independentemente dos microrganismos diazotróficos apresentarem um amplo espectro de habitats, todos utilizam uma maquinaria bioquímica básica para a fixação de N_2 , que é a nitrogenase.

Apesar de BORTELS (1932) ter observado que a fixação de nitrogênio pode ocorrer na ausência de molibdênio (Mo), até o final da década de 70, pesquisadores acreditavam que *Azotobacter vinelandii* e outros microrganismos fixadores de nitrogênio continham uma única nitrogenase dependente de Mo. Esta nitrogenase, ou nitrogenase clássica como é mais conhecida atualmente, é um complexo enzimático composto de duas metalo-proteínas, designadas **Fe-proteína (dinitrogenase)** e **MoFe-proteína (dinitrogenase redutase)**, ambas requeridas para a catálise (DEAN e JACOBSON, 1992).

Entretanto, os estudos conduzidos por BISHOP et al., (1980) e ROBSON et al., (1986) demonstraram que existem sistemas alternativos da nitrogenase, independentes geneticamente, sendo eles:

1. A nitrogenase clássica ou dependente de molibdênio (Mo) – codificada por genes *nif*.
2. A nitrogenase dependente de Vanádio (V) – codificada por genes *vnf*.
3. A nitrogenase dependente de Ferro (Fe) – codificada por genes *anf* (EVANS e BURRIS, 1992; TEIXEIRA, 1997).

A nitrogenase clássica é a que se encontra presente em todos os microrganismos diazotróficos estudados até o momento. A nitrogenase dependente de Vanádio é um complexo enzimático contendo este elemento na composição do cofator. Este cofator só é sintetizado quando em ausência de molibdênio. Uma nitrogenase alternativa não contém nem Molibdênio nem Vanádio e é induzida apenas na presença de Ferro, sob condições de deficiência de Mo e Vanádio (BISHOP e PREMAKUMAR, 1992; DAVIS et al., 1996). Estirpes com deleções nos genes estruturais (*nifHDK*) facilitaram o isolamento da nitrogenase que contém Fe de *Azotobacter vinelandii* (BISHOP et al., 1980) e da nitrogenase dependente de Vanádio de *Azotobacter chroococcum* (ROBSON et al., 1986).

Desde então, a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e já foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (ZINONI et al., 1993; LI et al., 2005).

Apesar do interesse de diversos autores no estudo da genética e do mecanismo de regulação tanto da nitrogenase clássica quanto das nitrogenases alternativas, a nitrogenase clássica ainda é a mais estudada.

Considerando a nitrogenase clássica como padrão, em geral, a redução do substrato envolve três tipos básicos de transferência de elétrons: i) redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons, ii) transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína através de um processo dependente de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/elétron transferido) e iii) transferência de elétron para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína. Portanto, em condições ótimas, a estequiometria da reação catalítica responsável pela redução do N₂ a duas moléculas de amônio é usualmente descrita como abaixo (SIMPSON e BURRIS, 1984):

A nitrogenase, além de catalisar a redução de N₂ a amônio, reduz prótons a hidrogênio e também pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto (KIM e REES, 1994). Uma reação particularmente importante é a redução de acetileno a etileno, a qual é muito utilizada para se medir indiretamente a fixação de nitrogênio, técnica que além de econômica, é bastante sensível e rápida (RIVAS, 2002).

3.4.1.2 Genes da fixação de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (nitrogen fixing), os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo de FBN. O estudo da genética de *Klebsiella pneumoniae* levou à descoberta dos 20 genes envolvidos na FBN. Neste microrganismo, os genes *nif* encontram-se organizados em 7-9 “operons”, ocupando uma região de aproximadamente 24 Kb entre os genes *shiA* e *hisD* (ARNOLD et al., 1998). Desses 20 genes *nif* identificados em *K. pneumoniae* 14 foram encontrados na maioria das bactérias diazotróficas. O gene *nifH* codifica para a unidade estrutural da dinitrogenase redutase e os genes *nifD* e *nifK* para as subunidades estruturais da dinitrogenase. Os genes *nif*, principalmente o gene *nifH*, tem sido utilizado como marcador no estudo de organismos fixadores de nitrogênio. O estudo da sequência desses genes também pode ser empregado

para caracterizar a diversidade genética de bactérias diazotróficas. De acordo com POLY et al., (2001), a estrutura do gene *nifH* reflete a adaptação às variações de diversas condições do meio ambiente, tais como temperatura, composição do solo, etc.

Em algumas bactérias diazotróficas outros genes tais como: *ntrA*, *ntrB*, *fix*, *fdx*, *mf* e *nod* codificam para proteínas que, indiretamente, desempenham função essencial para a FBN como: a regulação no nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoriamento e sinalização do nível de N-celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até o estabelecimento da interação bactéria-planta (BALDANI et al., 2002).

O tipo de organização dos genes *nif* não é universal, e estudos de caracterização em bactérias diazotróficas de vida livre ou em associação têm resultado em um quadro muito complexo da organização estrutural desses genes (MERRICK, 1993).

3.4.2 Solubilização do fosfato inorgânico (Pi)

Apesar de ser abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica, o fósforo (P) é um elemento limitante do crescimento vegetal. Representa um dos mais importantes nutrientes devido à sua atuação estrutural, funcional, e na transferência de energia. Os microrganismos, bactérias e fungos, têm um papel central no ciclo natural do P. Muitos tipos de solos são deficientes em fósforo porque a forma solúvel, é pouco disponível para as plantas (BARROTI e NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). As maiores reservas de P inorgânico são rochas e outros depósitos minerais, porem, uma considerável porção de P é acumulada em grande parte nos solos agrícolas em consequência de aplicações regulares de fertilizantes químicos. Contudo, quase a totalidade do fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo é rapidamente imobilizada logo após sua aplicação, devido à sua alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, tornando-se indisponível para as plantas (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). As bactérias solubilizadoras de fosfatos dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos ou seja pela diminuição do pH; consequentemente, ocorre a produção de fosfato disponível que pode ser capturado pelas plantas (NAUTIYAL, 1999; VASSILEV e VASSILEVA, 2006).

O segundo maior componente de P no solo é de origem orgânica, contribuindo com 30% a 50%, em media, na composição do P total do solo. Este P deve ser hidrolisado para

a forma inorgânica para poder tornar-se disponível para as plantas, processo este mediado por a enzima fosfatase alcalina (FA) produzida principalmente por microrganismos (GYANESHWAR et al., 2002).

Neste contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Entre os gêneros bacterianos conhecidos estão *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia* (GOLDSTEIN et al., 1986; RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; VERMA et al., 2001). Portanto, a capacidade de bactérias epifíticas e endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico é alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal. É interessante salientar que as bactérias endofíticas, com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, ganham importância durante o processo de colonização, pois podem, inicialmente, se aderir à superfície externa do hospedeiro, produzir ácidos e, conseqüentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal.

Apesar de diversas bactérias solubilizadoras de fosfato ocorrerem no solo, frequentemente seu número não é suficiente para suprir também outros microrganismos estabelecidos na rizosfera, assim como não é o suficiente para um aumento substancial de crescimento vegetal. Portanto, o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato como inoculantes é uma alternativa almejada para o aumento do desenvolvimento e produção vegetal (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; GYANESHWAR et al., 2001). Diversos trabalhos abordam a relação de bactérias solubilizadoras de fosfato promovendo o crescimento de diversos vegetais como *Rhizobium leguminosarum* em milho (CHABOT et al., 1998), *Azotobacter chroococcum* em trigo (KUMAR e NARULA, 2001), *Pseudomonas fluorescens* em feijão (KATIYAR e GOEL, 2003).

A presença de microrganismos solubilizadores foi constatada na maioria dos solos investigados (JONES et al., 1991; NAHAS et al., 1994) e foram determinados alguns fatores que influenciaram seu crescimento: o tipo de solo, a espécie e a idade da planta (ODUNFA e OSO, 1978). Foi constatada maior presença de bactérias solubilizadoras em leguminosas do que em gramíneas (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Por outro lado, foi comprovada a presença de microrganismos endofíticos fixadores de nitrogênio

com capacidade de solubilizar fosfatos naturais, em quantidades acima de suas necessidades, tornando parte disponível às plantas. Esses resultados propiciaram o desenvolvimento de programas de inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos, com resultados favoráveis (YOUNG, 1990). Dessa forma, a pesquisa das condições de crescimento desses microrganismos no solo constitui um potencial a ser explorado.

3.4.3 Atividade de glicanases

3.4.3.1 Pectinases e endoglicanases

As substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (SILVA et al., 2005; GAINVORS et al., 1994). A capacidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos são os utilizados industrialmente, pois secretam cerca de 90% das enzimas produzidas. (BLANDINO et al., 2001). A síntese destas enzimas sofre influência dos componentes do meio de cultura, particularmente da fonte de carbono, como pectina e derivados (GUMMADI et al., 2003; BLANDINO et al., 2001) e das condições de cultivo, como pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (SOUZA et al., 2003).

Substâncias pécticas formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material situado entre as paredes primárias de células de vegetais superiores (ALMEIDA et al., 2005). Quimicamente, são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, compostos de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (KASHYAP et al., 2000; GUMMADI et al., 2003) e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases: íons sódio, potássio ou amônio (KASHYAP et al., 2000; SAKAI et al., 1993). Ao contrário das proteínas, ácidos graxos e ácidos nucléicos, as substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa (SAKAI et al., 1993). As enzimas pécticas ou pectinilíticas podem degradar as substâncias pécticas e são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação sobre a estrutura galacturônica da pectina (FUNGARO e MACCHERONI Jr, 2002). As enzimas que quebram as ligações glicosídicas por hidrólise são chamadas de poligalacturonases e aquelas que atuam por transeliminação são

chamadas liases. As poligalacturonases e as pectato liases podem ser subdivididas ainda, em endo e exopoligalacturonases e endopectato liases e exopectato liases (SAID e PIETRO, 2002).

Celulose é o polissacarídeo mais abundante da terra e o principal constituinte da parede celular das plantas (RECOUVREUX et al., 2005). É um polímero linear de unidades de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. A celulose é insolúvel e, portanto, seu aproveitamento depende de sua degradação em monômeros. Substratos naturais celulósicos são compostos de cadeias heterogêneas de polissacarídeos entrelaçadas com variáveis graus de cristalinidade, de hemiceluloses e de pectinas embebidas em lignina (RECOUVREUX et al., 2005). Para degradar a celulose, os microrganismos produzem múltiplas enzimas, as celulasas que são produzidas e liberadas ao meio ou mantidas associadas à célula. Os componentes dos sistemas celulase foram inicialmente classificados com base no seu modo catalítico de ação, porém, mais recentemente foram classificados segundo suas propriedades estruturais. Três tipos principais de atividades enzimáticas foram encontradas: (i) endoglicanases, (ii) exoglicanases e (iii) β -glicosidases. Endoglicanases quebram, ao acaso, sítios amorfos da cadeia polissacarídica da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e novas extremidades. Exoglicanases agem em extremidades redutoras ou não-redutoras da cadeia polissacarídica da celulose, liberando glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolase) como principais produtos. Exoglicanases podem agir em celulose microcristalina. β -glicosidases hidrolizam celodextrinas solúveis e celobiose a glicose. Celulasas são diferentes das outras glicosídeos hidrolases pela capacidade de hidrolizar ligações β -1,4-glicosídicas entre resíduos de glicose (LYND, 2002).

Bactérias endofíticas penetram ativamente em tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como pectinases e celulasas (REINHOL-HUREK e HUREK, 1998). Numerosas bactérias endofíticas como *Azoarcus* sp (HUREK et al., 1998) e *Pseudomonas fluorescens* (QUADT-HALLMANN et al., 1997) produzem enzimas pectinolíticas. A produção dessas enzimas é regulada de modo a serem produzidas apenas no início da colonização e depois são reprimidas para evitar maiores danos à planta (VERMA et al., 2001).

3.4.4 Antifúngicos

Os antibióticos são metabólitos secundários que iniciam seu acúmulo no meio de cultura no fim da fase de crescimento exponencial. Estes produtos não são essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos que os produzem, mas são capazes de lhes conferir vantagem evolutiva. Assim, em termos competitivos, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Esses tipos de substâncias matam ou inibem o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades. Antibióticos antifúngicos têm função de controlar biologicamente patógenos de plantas (POTERA, 1994; LEIFERT et al., 1995). Nesse sentido, os antibióticos têm sido utilizados com fins terapêuticos no tratamento de doenças infecciosas. Uma linhagem do complexo *Burkholderia cepacia* produz um metabolito antifúngico muito ativo contra um largo espectro de fungos (QUAN et al., 2006). Esta substância tem suscitado um interesse crescente como biopesticida no controle biológico de fungos e outras pragas que afetam plantas e culturas agrícolas de interesse comercial.

3.6 Aplicações de proteínas auto-fluorescentes (AFPs)

Os microrganismos desempenham um papel central em muitos processos que são de importância fundamental para ciclos naturais e função de ecossistemas. Estes processos incluem o reciclagem da matéria orgânica, finalização de ciclos de biogeoquímicos, promoção do crescimento vegetal e fertilidade do solo. O homem procura explorar estas atividades; assim, micróbios são usados como inoculantes agrícolas, para biodegradação, em fermentadores industriais etc (LARRAINZAR et al., 2005).

Naturalmente, os microrganismos podem também ser prejudiciais e podem causar doenças nos seres humanos, em animais ou plantas. Por sua importância, os microrganismos estão sendo extensivamente pesquisados na era científica moderna. A maioria das pesquisas estuda microrganismos cultivados, embora se reconheça que culturas puras em laboratório não representam adequadamente o ambiente microbiano natural. No entanto, estes estudos renderam uma riqueza de valiosos dados em fisiologia microbiana, expressão gênica que provou aplicável para micróbios que crescem em uma gama de ambientes. Porém, também ficou aparente que estes estudos partiram da premissa

que não é possível entender completamente o comportamento de micróbios em ambientes naturais a partir de estudos de laboratório (LARRAINZAR et al., 2005).

A utilização de marcadores de Proteínas Autoflorescentes (AFP) é considerada uma ferramenta poderosa para explorar funções microbianas *in situ*. (LARRAINZAR et al., 2005) especificamente aplicados em ecologia microbiana. Parte deste trabalho focaliza a localização, dentro da planta, de bactérias devidamente marcadas.

3.6.1 Identificação de GFP

AFP é o nome genérico dado a qualquer grupo de proteínas que emitem autofluorescência como iluminação a comprimentos de onda dentro de uma excitação específica variável e sem exigências de substrato. A primeira AFP descoberta foi a luz verde designada como GFP (Green Fluorescent Protein). A proteína GFP é a AFP mais amplamente estudada, mas o número de outras proteínas e variantes com características de fluorescência discrepantes aumentou continuamente; existe atualmente uma grande variedade de AFPs desenvolvidas para aplicações em biologia celular, bioquímica e microbiologia. A proteína de cor verde fluorescente (GFP) original foi descoberta na água-viva *Aequorea victoria*, nos anos sessenta (SHIMOMURA et al., 1962). Os GFPs acontecem em uma variedade de coelenterados como espécies das classe *Hydrozoa*, com *Aequorea*, *Obelia*, e *Phialidium* e da classe *Anthozoa* com a espécie *Renilla* (WARD e CORMIER MJ, 1979). A razão ecológica atrás disto ainda é desconhecida.

Estudos bioquímicos e de cristalografia em GFP foram realizados entre os anos de 1970 e 1980 conduzindo a uma compreensão detalhada da proteína GFP, mas só em 1992 o gene foi clonado (PRASHER et al., 1992). Uma segunda inovação foi obtida com a expressão do gene de *gfp* em células procarióticas e outras eucarióticas (CHALFIE et al., 1994). Estes estudos de expressão heteróloga foram cruciais, pois demonstraram que o gene continha toda a informação necessária para a síntese pós-transcricional do fluoróforo em outros organismos produzindo fluorescência sem a adição de substratos exógenos.

3.6.2 Proteínas fluorescentes vermelhas

Matz et al., (1999) deduziram que também poderia ser possível achar AFPs em organismos não-bioluminescentes. Para formular esta hipótese basearam-se nas informações de que os princípios físicos de bioluminescência são comuns no reino animal, portanto, a ocorrência de variações no nível molecular sugeriria alguma evolução independente e relativamente recente em grupos filogenéticos diferentes (REES et al., 1998). Então, tais antepassados fluorescentes ainda poderiam estar presentes em organismos de não-bioluminescentes. Testando esta hipótese, os autores tentaram amplificar cDNAs de espécies de coral da classe Anthozoa usando primers degenerados baseados em segmentos conservados de *Aequorea* GFP. A estratégia rendeu seis homólogos distantes de GFP que compartilhavam apenas 26% a 30% da sequência conservada de identidade de vários GFP com características estruturais. As seis proteínas exibiram características de fluorescência que eram mais semelhantes às de *Renilla* GFP e variantes mutados de *Aequorea* GFP que do tipo selvagem GFP. Uma destas proteínas foi isolada do coral *Discosoma striata* originalmente nomeado como drFP583, mas posteriormente renomeado como DsRed para fins de comercialização, sendo extensivamente desenvolvido e aplicado nos últimos quatro anos MATZ et al., (1999).

3.6.3 Caracterização de proteínas DsRed

DsRed é uma proteína auto-fluorescente de 28-kDa responsável pela coloração vermelha no coral *D. striata*. DsRed tem um espectro de fluorescência que difere significativamente de GFP, tem um pico de excitação de 560 nm e seu pico de emissão é a 580 nm (TSIEN RY, 1999). As desvantagens principais de DsRed, porém, são a maturação lenta (MIYAWAKI, 2002).

3.6.4 Utilização de AFPs para o estudo de interações microrganismo-planta

A capacidade de visualizar microrganismos *in situ* fornece uma nova e poderosa ferramenta para o estudo das interações microrganismo-planta. Uma vantagem de usar os sistemas AFP-reporter para estudos *in situ* é que permitem a visualização direta das bactérias marcadas no nível celular, sem a adição de substratos exógenos e de uma maneira não destrutiva das células microbianas (LARRAINZAR et al., 2005).

7 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos em nosso estudo pode-se concluir que:

- 1- Os dados indicam que a adubação orgânica, comparada com a ausência de adubação em cana-de-açúcar não afetou a diversidade de BEFN cultiváveis em termos quantitativos.
- 2- Observou-se, porém, a ocorrência de uma diferença qualitativa, com o isolamento de quatro gêneros (*Agrobacterium*, *Acidovorax*, *Acinetobacter* e *Burkholderia*), presentes na cana sob adubação orgânica e ausentes na sem adubação e vice-versa, três gêneros ausentes na primeira e presentes na segunda (*Bacillus*, *Erwinia* e *Azoarcus*).
- 3- O uso das técnicas de PCR e de Dot-Blot foi importante para se detectar um grande número de isolados *nifH* positivos.
- 4- A adubação orgânica ou convencional não estimularam a baixa atividade antifúngica apresentada pelos isolados.
- 5- As adubações orgânica e inorgânica afetaram pouco o número de isolados solubilizadoras de fosfato.
- 6- A maior porcentagem de produtoras de endoglicanase foi encontrada entre os isolados provenientes de cana-de-açúcar sob adubação orgânica.
- 7- A adubação orgânica não estimulou o número de bactérias produtoras de pectinase.
- 8- O uso de genes “repórter” *gfp* e *DsRed* facilitou a observação “*in planta*” de diferentes padrões de colonização de endófitos geneticamente modificados em plântulas de cana-de-açúcar.
- 9- A capacidade de colonização da planta varia dependendo do gênero bacteriano, tendo-se também observado incapacidade de colonização, apesar de todas as bactérias testadas terem sido isoladas de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUAK, W.; NORMAND P.; HEULIN T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 961–967, 1999.

ADAMS, M .W.W. 1995. Thermophilic Archaea: an overview. In: Archaea – a laboratory manual: Thermophiles. Robb, F.T. & Place, A.R. (eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 3-7.

ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1937-1942, 2005 .

ARAUJO, W. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 203. p. 715-738, 1988.

ANJOS, I. A.; Bastos, L. A.; Garcia, J. C.; Monteiro, P. A.; Carvalho, G. J. Effects of organic fertiliser and harvest date on quality and agricultural yield and of raw-sugar of two sugarcane cultivar (plant cane). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n, 1, 2007.

ASIS, C. A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic *Pantoea agglomerans* and non-diazotrophic *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2003.

AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio na cana planta: doses e fracionamento. **Revista STAB**, v. 4. p. 32-36, 1986.

BALDANI J . I.; CARUSO, L.; BALDANI, V . L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J.. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI J .I. (2000). Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs. In: Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity. Eds. Pedrosa F.O.; Hungria M.; Yates M.G.; Newton W.E.; Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plants pathogen, as *Herbaspirillum* comb. Nov.; and classification of group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria. EDUCS, Caxias do Sul, p. 433, 2002.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P. C. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 107-129, 1995.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2043-2050, 2000.

BAUMANN, P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. **Journal of Bacteriology**, v. 96, p. 39-42, 1968.

BEKRI, M. A.; DESAIR, J.; KEIJERS, V.; PROOST, P.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M.; VANDERLEYDEN, J.; VANDE BROEK, A. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 2440-2447, 1999.

BERG, G.; MARTEN, P.; BALLIN, G. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape – occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. **Microbiological Research**, v. 151, p. 19-27, 1996.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 215-229, 2004.

BERGEY'S. **Manual of Systematic Bacteriology**, J.G.Holt, Editor-in-Chief, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, v.1-4, 1984-1989.

BERNARDET, J. F.; HUGO, C.; BRUUN, B. The genus *Chryseobacterium*. In The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edn, release 3.7 (2001). Edited by M. Dworkin et al. New York: Springer. Disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/> Acesso em 11.set.2006.

BINKS, P. R.; NICKLIN, S.; BRUCE, N. C. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 4, p. 1318-1322, 1995.

BINNS, A. N.; THOMASHOW, M. F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Reviews Microbiology**, v. 42, p. 575- 606, 1988.

BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L.; HETHERINGTON, D. R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 1244-1251, 1980.

BISHOP, P. E.; PREMAKUMAR, R. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. p. 736-762, 1992.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C.; Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 497-503, 2001.

BODDEY, R. M.; MORAES SÁ, J. C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. In: International Symposium - Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. 787-799, 1995.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BOHLOOL, B. B.; LADHA, J. K.; GARRITY, D. P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, v. 141, p. 1-11, 1992.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a. Ed. New York: Springer-Verlag,. 2001.

BORTELS, H. Weitere unthersuchungen uber die bedeutung von molybdan, vanadium,wolfram und anderen erdascenstoffen fur stickstoffbindende und andere mikroorganismen. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 95, p. 193-218, 1932.

BOSSHARRD, P. P. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase negative gram positive cocci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2065-2073, 2004.

BRITISH PETROLEUM. BP. Statistical Review of World Energy. **British Petroleum**, London. 1996. p.11.

BURNS, R. C.; HARDY, R. W. F. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York: Springer-Verlag, p. 189, 1975.

BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation, New York, London, Chapman e Hall, 1992.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CABARELLO-MELLADO.; MARTINEZ-ROMERO. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1532-1537, 1994.

CANUTO, E. L.; SALES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*, Rio de Janeiro, v. 37, p. 67-72, 2003.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2767-2772, 1996.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOEPPER, J. W.; AUTON, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1615-1618, 1998.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** v. 263, p. 802–5, 1994.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.783-787, 2000 .

CHELIUS, M. K.; LEPO, J. E. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified *nifH* sequences from wetland plant rhizosphere communities. **Environmental Technology**, v. 20, p. 883–889, 1999

CHENG-HUI X.; YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 889-893, 2006.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 37-43, 1994.

CHRISTENSEN, H. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of new genus or species? proposal modify recommendation 30b of the bacterial code (1990 Revision). **International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology**, v. 51, p. 2221-2225, 2001.

CHUN, J.; GOODFELLOW, M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 240-245, 1995 .

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 840-862, 2004.

COTTER, E. J.; DOWLING, V. Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their role in disease expression. **Plant Pathology**, v. 35, p. 329-36, 1986.

CLEMENTS, H. F. Sugarcane crop logging and control: principles and practices. [London]: Pitman Publishing; [Honolulu]: The University Press of Hawaii, p. 520, 1980.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 719-729, 2003.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (Produção de cana cresce e safra se mantém histórica). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>. Acesso em: 31 Ago.2006.

COSTA, M. A.; DE OLIVEIRA, R. G.; SACHETTO, M. G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.

CULLIMORE, J. V.; BENNETT, M. J. Nitrogen assimilation in the legumine root nodule: current status of the molecular biology of the plant enzymes. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 461-466, 1992

DALTON, D.A.; KRAMER, S.; AZIOS, N.; FUSARO, S.; CAHILL, E.; KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479, 2004.

DAVIS, R.; LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V. K.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1445-1450, 1996.

DEAN, D. R.; JACOBSON, M. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. p. 763-834, 1992.

DENTON, M., KERR, G.K. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 57-80, 1998.

DELGADO, A. A.; DELGADO, A. P. Produção do açúcar mascavo, rapadura e melaço. Piracicaba: Ed. Alves, 154 p. 1999.

DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 201-210, 1999.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DONG, Y. M.; INIGUEZ, A. L.; TRIPLETT, E. W. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant and Soil**, v. 257, p. 49-59, 2003.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DOS REIS, JR.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, p. 153-159, 2000.

DRANCOURT, M. 16S ribosomal dna sequence analysis of the large collection of environmental and clinical unidentifiable bacteria isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3623-3630, 2000.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene *gfp*. **FEMS Letters** v. 253, p. 67-74, 2005.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5284-5293, 2001.

EL-FIKI, F.; GILES, K.L. *Agrobacterium tumefaciens* in agriculture and research. **International Review of Cytology**. v. 13, p. 47-58, 1981.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp, in wild rice species and land races of *Oriza sativa* in comparison with modern races. **Environmental microbiology**, v. 2, p. 131-141, 2000.

ESPINOSA-URGEL, M. Plant-associated pseudomonas populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. **Plasmid**, v. 52, p. 139-150, 2004.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall,. p. 1-42, 1992.

FAPESP, Plástico renovável, Ed. Imprensa 142 – Dezembro 2007. Disponível: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3412&bd=1&pg=2&lg=> Acesso em: dez. 2007.

FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 111-148, 1995.

FONTANA, C.; FAVARO, M.; PELLICIONI, M.; PISTOIA, E. S.; FAVALLI, C. Use of Microseq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 615-619, 2005.

FOX, G. E. The structure and evolution of archaebacterial ribosomal RNA. In: WOESE C. R. e WOLFE R.S. **The bacteria**. New York: Academic Press, 1985, p. 257-310.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathology**. v. 20, p. 68-74, 1994.

FRANKE, I. H.; FEGAN, M.; HAYWARD, C.; LEONARD, G.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p. 1681-1693, 1999.

FRENEY, J. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 38-41, 1991.

FUNGARO, M. H. P.; MACCHERONI J R., W. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos. In: Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C.; Nass, L. L. and Valois, A.C.C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento-microrganismo**. Jaguariúna: Embrapa. 2002, 426-453.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**., v. 68, p. 280-300, 2004 .

GAINVORS, A.; FREÂZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectinlyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, p. 1493–1499, 1994.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTA, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, 261:754-756. 1993.

GAVIN, S. E. Evaluation of the rapid coryne identification system for *Corynebacterium* Species and Coryneforms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1692-1695, 1992.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GEVERS, D.; DAWYNDDT, P.; VANDAMME, P.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE VOS P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 361, p. 1911–1916, 2006 .

GILLIS, M., TRAN VAN, BARCIN, M., GOOR, P.M., HEBBAR, P., WILLENS, P., Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for n₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International journal of systematic bacteriology**, v.45, p. 274-289. 1995.

GLENN, A. R.; DILWORTH, M.J. Ammonia movements in rhizobia. **Microbiological Sciences**, v. 2, p. 161-167. 1985

GLICK B. R.; BASHAN Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens, **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 353-378, 1997.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agricultural**, v. 1, p. 51-57, 1986.

GOUGH, C.; VASSE, J.; GALERA, C.; WEBSTER, G.; COCKING, E.; DÉNARIÉ, J. Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant and Soil**, v. 194, p. 123-130, 1997.

GONÇALVES, R. C.; Etiology of bacterial leaf spot on eucalyptus in Brazil. N.- Folhas: 76. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.

GUMMADI, S. N.; PANDA, P. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review, **Process Biochem**, v. 38, p. 987–996, 2003.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117-126, 2001.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2634-2645, 2001.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, p. 131, 2002.

GYANESHWAR. P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**. v. 45, p. 83-93, 2002.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology** v. 43, p. 895-914, 1997.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HANKIN, L.; ZUCHER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology** v. 22, p 205-209, 1971.

HOFFLAND, E.; PIETERSE, C. M. J.; BIK, L.; VAN PELT, J. A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.46, p. 309-20, 1995.

HÖFTE H, DE GREVE H, SEURINCK J, JANSSENS S, MAHILLON J, AMPE C, VANDEKERCKHOVE J, VANDERBRUGGEN H, VAN MONTAGU M, ZABEAU M (1986). "Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715". **European Journal of Biochemistry / FEBS** v. 161, 273-80, 1986.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1913-1923, 1994.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2667-77, 2004.

JACKMAN, S. C.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Survival, detection and containment of bacteria. **Microbial Releases: viruses, bacteria, fungi**, v.1, p. 125-154, 1992.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A.. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 1262-5, 1985.

JAMES , E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1997.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, and endophyte diazotrophic colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, 785-797, 1997a.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Gluconacetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.3676-3683, 1997.

JIMENEZ-ZURDO, J. I.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 917–921, 1996.

JONES, D.; SMITH, B. F. L.; WILSON, M. J.; GOODMAN, B. A. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. **Mycological Research**, v. 95, p. 1090-1093, 1991.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae*, In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed), **Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology**, vol . I. The Willians and Wilkins Co., Baltimore. (1984) p. 234-256.

JUHNKE, M. E.; MATHRE, D. E.; SANDS, D. C. Relationship between bacterial seed inoculum density and rhizosphere colonization of spring wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 591-595, 1989.

KANVIDE, L.; SOLIMAN, M.H.; WARDHAN, H.; NOWELL, L.; FOX, D.; SASTRY, G.R.K. Studies on the diazotrophic nature of *Agrobacterium*. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 3, p. 309-312, 1987.

KANVINDE, L., SASTRY, G.R.K. (1990) *Agrobacterium tumefaciens* Is a Diazotrophic Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2087-2092.

KASHYAP, D.R.; KASHYAP, S.; CHANDRA, A.; KAUL .; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 277–282, 2000.

KATIYAR, V.; GOEL, R.. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, v. 158, p. 163-168, 2003.

KAVANAGH, E.P., HILL, S. Oxygen inhibition of nitrogenase activity in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 1307-1314, 1993

KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*ammophila arenaria* and *elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479, 2004.

KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*, New York, v. 33, p. 389-397, 1994.

KIRCHHOF G.; ECKERT B.; STOFFELS M.; BALDANI J. I.; REIS V. M.; HARTMANN A. *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. 157-68, 2001.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLOEPPER, J. W. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, v. 82, p. 726-727, 1992.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1219-1232, 1992 .

KLOEPPER, J. W.; MAHAFFEE, W.; McINROY, J.A.; BACKMAN, P.A. Comparative analysis of methods for recovering plant growth-promoting rhizobacteria from roots, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 953-957, 1991.

KONEMANN, E. W.; ALLENS, S. P.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W. **Clinical Microbiology**. 5 ed. MEDSI, 2000.

KOVTUNOVYCH, G.; LAR, O.; KAMALOVA, S.; KORDYUM, V.; KLEINER, D.; KOZYROSKA, N. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissue. **Plant and Soil**, v. 215, p. 1-6, 1999.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybeab-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, V.; NARULA, N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. **Microbiological Research**, v. 156, p. 87-93, 2001.

KUC, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience** v. 32, p. 854-60, 1982.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, p. 637-642, 2006.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LARRAINZAR, E.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J.P. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 257-277, 2005.

LEIFERT, C.; LI, H.; CHIDBUREE, S.; HAMPSON, S.; WORKMAN, S.; SIGEE, D.; EPTON H. A. S.; HARBOUR, A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. **Annual Review of Microbiology**. 78:97-108. 1995.

LI, H.; PELLEGRINI, M.; EISENBERG, D. Detection of parallel functional modules by comparative analysis of genome sequences. **Nature biotechnology**, v. 23, p. 253-60, 2005.

LIBA, C. M.; FERRARA, F. I. S.; MANFIO, G. P.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALBUQUERQUE, R. C.; PAVAN, C.; RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived liquens and ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytormones. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.

LIJNEN, H. R.; HOEF, B. V.; UGVU, F.; COLLEN, D.; ROELANTS, I. Specific proteolysis of human plasminogen by a 24 kda endopeptidase from a novel *Chryseobacterium* sp **Biochemistry**, v. 39, p. 479-488, 2000.

LIU, H. P.; LEITE, M. C. C.; WANG, S. L. Doenças da cana-de-açúcar no Norte do Brasil. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil, 1., 1979, São Paulo. **Anais...** São Paulo: STAB, p. 227-230, 1979.

LIU, X., ZHAO HONGXING., CHEN, S. Colonization of Maize and Rice Plant by Strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology** v. 52, p. 186-190, 2006.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002

LOGANATHAN, P.; SUNITA, R.; PARIDA, A. K.; NAIR, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant Eleusine coracana L. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.167-172, 1999.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 504-11, 2004.

LYND, L.R., WEIMER, W. H.; VAN ZYL.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

SHEKHAR. M. S.; AZADA, I. S.; RAVICHANDRANA, P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 261, p. 1122-1127, 2006

MADIGAN M; MARTINKO J (editors). (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall. ISBN 0131443291.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science** v. 250, p. 1002-1004, 1990.

MATZ, M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAIISKY, A. G. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 969–973, 1999.

MAYEUX, P.A. Some studies on the microbial flora of sugar-cane. M.S Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge. 1960.

MATSUOKA, S.; MARGARIDO, L. A. C.; LAVORENTI, N. A.; ELIAS JÚNIOR, R.; PINELL, D. M. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em um sistema orgânico de produção. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., 2002, Recife. **Anais...** Recife: [s.n.], 2002. p. 301-308.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342. 1995

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 369-374, 2000.

MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., ed. New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 43-54, 1993.

MÉTRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. Increase in salicylic acid

at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science** v. 250, p. 1004-1006, 1990.

MILLER, W. G.; BATES, A. H.; HORN, S. T.; BRANDL, M. T.; WACHTEL, M. R.; MANDRELL, R. E. Detection on surfaces and in Caco-2 cells of *Campylobacter jejuni* cells transformed with new *gfp*, *yfp*, and *cfp* marker plasmids. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, p. 5426-5436, 2000.

MINKWITZ, A.; BERG, G. Comparison of Antifungal Activities and 16S Ribosomal DNA Sequences of Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 139-145, 2001.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free Cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-11, 1990.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MIYAWAKI, A. Green fluorescent protein-like proteins in reef *Anthozoa* animals. **Cell structure and Function**, v.27, p. 343-47, 2002.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOULIN, L., MUNIVE, A., DREYFUS, B., BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. **Nature** v. 411, p. 948-950, 2001.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association **FEMS Microbiology Ecology** v. 54, p. 57-66, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURILLO, C. Produção maior de etanol pode ter impacto no preço dos alimentos nos EUA e Europa, diz especialista. Disponível em <http://www.valoronline.com.br/> Acesso em 18. maio. 2007.

MURRAY, P. R.; BAROW, E. J.; PFALLER, M. A.; TEWOVER, F. C.; YOLKEN, K. H. **Clinical Microbiology**, 7 ed. Washington D. C, ASM Press., 1997.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of nitrogen fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, v.29, p.157-164, 1999 .

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 43-48, 1994.

NAUTIYAL C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 65-270, 1999.

NEWTON, W. E. N. Encyclopedia of Chemical technology, 4^a ed. 17: 172-204, John Wiley & Sons, Inc. New York. 1996.

NJOLOMA, J. P.; OOTA, M.; TAROURA, K.; SAEKI, Y.; AKAO, S. Colonization ability of *Herbaspirillum* spp. B501 gfp1 in sugarcane, a non-host plant in the presence of indigenous diazotrophic endophytes. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 836-841, 2006.

NODA, S.; OHKUMA, M.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; KUDO, T. Culture-independent characterization of gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4935–4942, 1999.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal**. Local:Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161. 40 p. 2003.

O' CALLAGHAN, K.J.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Xylem colonization of *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571 In: Martinez, E., Hernández, G (Eds), **Highlights of Nitrogen fixation Research**. Kluwer Academic /New York, Plenum Publisher, p. 145-147, 1999.

ODUNFA, V.S.A.; OSO, B.A. Bacterial population in the rhizosphere soils of cowpea and sorghum. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, v. 15, p. 413-420, 1978.

OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4926–4934, 1999.

OHKUMA, M.; NODA, S.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; KUDO, T. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2747–2752, 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **The New Phytologist**, v. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVARES, F. L. Taxonomia, Ecologia e Mecanismos Envolvidos na Infecção e Colonização de Plantas de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por Bactérias Diazotróficas Endofíticas do Gênero *Herbaspirillum*. 1997b. Tese (Doutorado) –.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/EMBRAPA. (Resumo on-line): <http://www.ia.ufrj.br/cpacs/tese/resumos/res160.htm#Retornar>

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves predominantly of Gramineae, **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing nitrogen bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.2, p. 205-215, 2002.

OLSON, J. B.; STEPPE, T. F.; LITAKER, R. W.; PEARL, H. W. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 36, p. 231-238, 1998.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; DOBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias diazotróficas na cultura de batata doce. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, p. 349-356, 1993.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**. v. 141, p. 13-39. 1992.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V.M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 763-770. 2004.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**: Springer-Verlag, 179-197, 1991.

PETTI, C.; A, POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16s rrna gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6123-6125, 2005.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **Plant Cell**, v. 8, p. 1225-1237, 1996.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 123-134, 2000.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant biology**, v. 4, p. 535-544, 2002.

PICENO, Y. M.; LOVELL, C. R. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 32–40, 2000a

PICENO, Y. M.; LOVELL, C. R. Stability in natural bacterial communities. II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 41–48. 2000b

PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. G. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repense*. **Journal of Plant Physiology**, v. 120, p. 181–187, 1985.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Microbiological research**, v. 152, p. 95–103, 2001.

POTERA, C. From bacteria: a new weapon against fungal infection. **Science**, v. 265, p. 605, 1994.

PRASHER, D. C.; ECKENRODE V. K.; WARD, W. W.; PRENDERGAST, F. G.; CORMIER, M. J.; BOKMAN, S. H. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v. 111, p. 229–233, 1992.

PROTEOBACTERIA. Discover Life: Tree of Life. Disponível em: <http://stri.discoverlife.org/mp/20m?tree=Proteobacteria&res=800> Acesso em: 06 jan. 2008.

QU, L.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, J. P. Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid “heterologous” sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5’ terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 11:5903-5919, 1983.

QUADT- HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUAN, C. S.; ZHENG, W.; LIU, Q.; OHTA, Y.; FAN, S. D. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1276-1284, 2006.

RAMOS, H. J. de O.; MARACCARI, L. D. B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 225-243, 2002.

RAMOS, P. L. Caracterização molecular de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas as gramíneas de importância econômica. 2002. 56p Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RECOUVREUX, Derce de O. S.; CARMINATTI, Claudimir A.; PITLOVANCIV, Danielle G. de A.; MIQUELETO, Ana Paula; OLIVEIRA, Itamar L. de; ANTONIO, REGINA V.; PORTO, LUISMAR M. Evidências da presença de celulose no Biofilme formado por *Chromobacterium violaceum*. Disponível em: <<http://www.Intelab.ufsc.br:8080/port/public/sinaferm2005Recowvreux%120et%20al%2002.pdf>> Acesso em: 12. maio. 2007.

REES, J. F.; WERGIFOSSE, B.; NOISET, O.; DUBUISSON, M.; JANSSENS, B.; THOMPSON E. M. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1211–21, 1998.

REINHOLD-HUREK B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 29-54, 1998a

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE-LEY, J. *Azoarcus* gen.nov., nitrogen-fixing protobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth) and description of two species, *Azoarcus indigens* sp nov and *Azoarcus communis* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 574-584, 1993.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK., T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 139-144, 1998b

REIS, Jr., F. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**. v. 206, p.205–211, 1999.

REIS, V. M.; PERIN, L.; REIS, Jr., F. B. Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar. Comunicado técnico – Embrapa, N.- 35, p. 1-5, 1999.

REIS, V. M. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm tree. **Critical Reviews in Microbiology** v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; REIS JUNIOR, F. B.; SALLES, J. F.; SCHLOTTER, M. Characterization of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schun.). **Symbiosis**, v.29, p.139-150, 2000.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.J.; VOGEL.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO. J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V.M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 401-405, 1994.

RENNIE, R. J.; DE FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 462-467. 1982.

RIBOSOMAL Database Project II. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>. Acesso em: 10. nov. 2007.

RIVAS, R. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217–5222, 2002.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p. 1808-19, 1996.

ROBSON, R. L.; WOODLEY, P. R.; PAU, R. N.; EADY, R. R. Second gene (*nifH*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, **The EMBO Journal**, v. 5, p. 1159-1163, 1986.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnonology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. Root colonization systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v. 35, p. 261-270. 2003a.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron, **Scientia Agricola**, v. 57, p. 723-728, 2000.

RUPPEL, S.; HECK-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and

within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, v. 145, p. 261-273, 1992.

SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, v. 265, p.123-129, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. Teresópolis: Livraria e Editora Eventos, v. 1. p.120. 2002.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in applied microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 3rd ed., New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAWADA, H.; KWYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.

SESSITCH, A .;REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Ewinia carotovora* subsp. Atroseptica, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p.2261-2268, 2002.

SESSITSCH, A.; HARDARSON, G.; DE VOS, W. M.; E. T. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v. 204, p. 35-45, 1998.

SHAFFER B. T.; WIDMER, F.; PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂-fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 12–21, 2000.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, p. 223–39, 1962 .

SHOLZ-SEIDEL, C.; RUPPEL, S. Nitrogenase and phytohormone activities of *Pantoea agglomerans* in culture and their reflection in combination with wheat plants. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 147, 319-328, 1992.

SILVA, F. C. da.; GUIMARÃES, D. H. P.; GASPARETTO, C .A. Rheology of acerola juice: effects of concentration and temperature. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v. 25, p. 121-126. 2005.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Sintomas de deficiência de potássio induzidos pelo acúmulo de aminoácidos e amônia em cana-de-açúcar, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, p. 329- 334, 1989.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase, **Science**, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SLY, L. I. Australian Microbial Diversity – Is its preservation in good hands? In: Proceedings of the Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Microbiology. 1997. Adelaide, 1997. Australian Collection of Microorganisms.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 485-492, 1992.

SMITH, S .E.; READ, D .J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2. ed., San Diego, Academic Press: 1996. 605 p.

SOARES, M. M. C. N.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 79-82, 2001.

SOARES, S. C.; SOARES, S.; LIMA, H. L.; GARCIA, S. Método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelo sistema radicular para avaliação rápida de resistência de repolho à podridão negra. **Journal of Biosciences**, v. 19, p. 53-56, 2003.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v. 35, p. 329-334, 2005.

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 455-458. 2003.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**; pure and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1990. 256p.

STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992. 943p.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043–1047, 2002 .

STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, John Wiley & Sons, 1991 329 p.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, K. K.; BRUJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen, **Plant and Soil**, v. 194, p. 25-36, 1997.

STURZ A. V.; CHRISTIE B. R.; MATHESON B. G.; ARSENAULT W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens, **Plant Pathology**, v. 48, p. 360-369, 1999.

SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia, **Acta Amazonica**. V.12, p. 15-22, 1982.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants, **Microbial Ecology**, v. 39, p. 49-55, 2000.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

TEIXEIRA, K. R. Bases moleculares e genética da fixação biológica de nitrogênio. Embrapa-CNPAB. Documentos, v. 32, p. 26, 1997.

TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 270, p. 223-232, 2005.

TOMBOLINI, R.; VAN DER GAAG, D. J.; GERHARDSON, B.; JANSSON, J. K. Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3674-3680, 1999.

TSIEN, R.Y. Rosy dawn for fluorescent proteins, **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 956-57, 1999.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂ -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 1414-1417, 1995.

ÚNICA - União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/cana_origem.asp. Acesso em: 21 maio.2007 .

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen-fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimate, **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, A.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU M.; LEEMANS, J. "Transgenic plants protected from insect attack". **Nature**, v. 328, p. 33-37, 1987.

VALVERDE, A.; VELÁSQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B. D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

VANDAMME, P.; BERNARDET, J. F.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HOLMES, B. New perspectives in the classification of the *flavobacteria*: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 827-831, 1994.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-437, 1996.

VANNESTE, J. L.; EDEN-GREEN, S. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues In: VANNESTE, J. L. Fire blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Oxon: CABI Publishing,. p. 9-36, 2000.

VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J.; TRIJSSENAAR, A.; VANT WESTENDE, Y. A. M.; HARTOG, F.; VAN LOON, L. C. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 716-24, 1997.

VAN WEES, S. C. M.; DE SWART, E. A. M.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 8711-8716, 2000.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-83, 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 137-144, 2006.

VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L, **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 371-380, 2005.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice, **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WANG, Q. THE RDP – II (RIBOSOMAL DATABASE PROJECT): The rdp sequence classifier. disponível em: http://rdp.cme.msu.edu/download/poster/asm_2004.pdf. 2004. Acesso em: maio, 2006.

WARD, W. W.; CORMIER, M. J. An energy transfer protein in Coelenterate bioluminescence: characterization of the *Renilla* green- fluorescent protein, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 781-788, 1979.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKENBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the ad hoc comitee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance, **Plant Cell**, v. 3, p. 1085-94, 1991.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria, **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WIDMER, F.; SHAFFER, B. T.; PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 374-380, 1999.

WILSON, K. J.; SESSITSCH, A.; AKKERMANS, A. D. L. Molecular markers as tools to study the ecology of microorganisms. IN: K. RITZ; DIGHTON, J.; GILLER, K. E., (Eds). **Beyond the Biomass: composition and function analysis of soil microbial communities.** CHICHESTER : JOHN WILEY, p.149-156. 1994.

WILSON, D. Endophyte – The evolution of a term, and classification of its use and definition. *Oikos*, Copenhagen, v. 73, p. 274-276, 1995.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution, **Microbiological Reviews**, v. 2, p. 221-271, 1987.

WOLF, A.; FRITZE, A.; HAGEMANN, M.; BERG *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1937–1944, 2002.

WOO, P. C. Y. Usefulness of the microseq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, p. 1996-2001, 2003.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; DE BRUIJN, F.; STOLFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. D. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth, **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan), **Plant and Soil**, v. 189, p. 239-244, 1997.

YOUNG, C.C. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soils, **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 36, p. 225-231, 1990.

YOUNG, C. C.; KÄMPER, P.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; ARUN, A. B. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce), **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 423–426, 2005.

ZEHR, J. P.; MELLON, M. T.; ZANI, S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3444–3450, 1998.

ZEHR, J. P.; MELLON, M.; BRAUN, S.; LITAKER, W.; STEPPE, T.; PAERL, H. W. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat., **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2527–2532, 1995.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M. STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p.539-554, 2003.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1174, p. 83-86, 1993.