

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ISOLADAS DE SOLOS EM REABILITAÇÃO APÓS A MINERAÇÃO DE BAUXITA⁽¹⁾

R. S. A. NÓBREGA⁽²⁾, F. M. S. MOREIRA⁽³⁾,
J. O. SIQUEIRA⁽³⁾ & A. S. LIMA⁽⁴⁾

RESUMO

As gramíneas, usadas comumente para reabilitação de áreas degradadas, podem formar associações em suas raízes com bactérias fixadoras de nitrogênio e, assim, contribuir para a sustentabilidade do ecossistema. Por outro lado, a diversidade microbiana exerce papel relevante na resiliência dos processos biológicos do solo, que incluem a fixação biológica de N₂. O presente estudo teve como objetivo a caracterização fenotípica de 72 isolados de bactérias diazotróficas associativas Gram-negativas, oriundos de áreas sob diferentes estratégias de reabilitação, após a mineração da bauxita em Poços de Caldas (MG), por meio da inoculação de amostras de solo nos meios de cultivo NFB, Fam e JNFb. Estirpes tipo e referência de espécies de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram usadas para comparação, uma vez que são capazes de crescer nestes meios. O dendrograma de similaridade baseado em sete características culturais dos isolados em meio de cultivo GNA revelou grande diversidade, sendo obtidos 50 grupos a 81 % de similaridade. A tolerância a NaCl em meio de cultivo batata/sacarose/ácido málico variou de 0 a 50 g L⁻¹, permitindo separar os isolados e estirpes tipo em cinco grupos. O diâmetro celular variou de 0,61 a 1,21 µm, e 13 isolados diferiram das estirpes tipo e referência. Os padrões de proteína total, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram bastante diversos, possibilitando a formação de 15 grupos com similaridade a 75 %. Não houve relação entre os grupos formados pelas várias características estudadas, tampouco destes com as áreas de origem dos isolados. Os meios de cultivo Fam e JNFb detectaram, além das espécies-alvo, outras não identificadas. A alta dissimilaridade da maioria dos

⁽¹⁾ Extraído da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, Parcialmente financiado pelo convênio ALCOA Alumínio S/A de Poços de Caldas e FAPEMIG. Recebido para publicação em dezembro de 2002 e aprovado em janeiro de 2004.

⁽²⁾ Doutoranda em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Posta 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista do CNPq. E-mail: rafaelanobrega@ufla.com.br

⁽³⁾ Professor do Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br; siqueira@ufla.br

⁽⁴⁾ Doutoranda em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista da CAPES. E-mail: adrislima@bol.com.br

isolados em relação a estirpes tipo, principalmente com relação aos padrões eletroforéticos de proteína total, admite a possibilidade da presença de novas espécies entre eles.

Termos de indexação: *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, proteína celular total, NFb, Fam, JNFb.

SUMMARY: *PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND DIVERSITY OF DIAZOTROPHIC ASSOCIATIVE BACTERIA ISOLATED FROM SOILS REHABILITATED AFTER BAUXITE MINING*

Grass species, which are frequently used for rehabilitation of degraded areas, can establish root associations with nitrogen fixing bacteria thus contributing to the ecosystem's sustainability. On the other hand, microbial diversity plays an important role in the resilience of biological processes, including N₂ fixation. This study aimed at the phenotypic characterization of 72 diazotrophic Gram-negative bacteria. Samples were isolated from areas under different rehabilitation strategies after bauxite mining in Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil, and inoculated in NFb, Fam, and JNFb media. Type and reference strains of Herbaspirillum, Azospirillum and Burkholderia species were used for comparison as they are able to grow in such media. The similarity dendrogram based on seven cultural characteristics of the isolates in GNA medium presented a great diversity, as 50 groups were formed with 81 % similarity. NaCl tolerance in the potato/sucrose/acid malic medium varied from 0 to 50 g L⁻¹ and allowed a separation of isolates and type strains into five groups. Cell diameters varied from 0.61 to 1.21 µm, and 13 isolates were not similar to the type strains. Fifteen groups with 75 % similarity were formed based on total proteins patterns obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Neither was there any relationship among groups based on the different characteristics, nor between these and the areas of bacteria isolation. Fam and JNFb media detected the target species as well as other unidentified ones. The high phenotypic dissimilarity among isolates and type strains, mainly regarding total protein electrophoresis profiles suggests that new species could be present within these populations.

Index terms: Herbaspirillum, Azospirillum, Burkholderia, total cellular proteins, NFb, Fam, JNFb.

INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é mediada por ampla gama de microrganismos procariotos que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência da FBN nos ecossistemas, como também a ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats terrestres (Moreira & Siqueira, 2002). Em geral, espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas de pastagem e de grãos (Magalhães & Döbereiner, 1984; Baldani et al., 1986; Döbereiner, 1992; Baldani, 1996; Dicello et al., 1997; Eckert et al., 2001), de tubérculos (Balota et al., 1997), cafeeiros (Santos et al., 2001) e fruteiras (Magalhães & Döbereiner, 1984; Weber et al., 2001).

A contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como a das simbioses (e.g. rizóbio e leguminosas), entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais.

Conseqüentemente, estas associações podem ser importantes nos sistemas de agricultura sustentável no Brasil (Baldani, 1996) e em sistemas perturbados que se encontram em estádios de reabilitação, uma vez que o N é um nutriente escasso nesses ecossistemas (Silva, 1994).

O conhecimento das condições biológicas do solo em termos de reabilitação é de grande interesse no contexto ecofuncional de áreas degradadas pela mineração (Siqueira et al., 1994), uma vez que a diversidade e a atividade microbiana do solo constituem fatores importantes na sustentabilidade dos ecossistemas. A redução da comunidade microbiana, com eventual extinção de espécies de microrganismos, pode acarretar não só a perda de importantes funções do solo e de estirpes inoculantes potenciais, mas também reduzir a habilidade dos sistemas naturais de superar os estresses.

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1 % dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar

que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura é atribuída a descobertas recentes na área da biologia molecular de microrganismos (Moreira & Siqueira, 2002).

A caracterização e a identificação de bactérias não são feitas apenas com base em caracteres morfológicos. Métodos genéticos, bioquímicos e fisiológicos são utilizados com este propósito (Ballows et al., 1991). Padrões eletroforéticos de proteínas totais solubilizadas por SDS (dodecil sulfato de sódio) para identificação de espécies bacterianas têm fornecido informações relevantes nos estudos de caracterização e taxonomia, pois a expressão do genoma microbiano resulta na síntese de aproximadamente 2.000 moléculas de proteínas (Jackman, 1985). A correlação entre resultados de hibridização DNA:DNA e do perfil eletroforético de proteínas (Vandamme et al., 1997) tem sido evidenciada. Este método permite, principalmente, diferenciar estirpes e espécies (Rademaker & Bruijin, 1997), sendo considerado uma ferramenta útil para o estudo da diversidade de microrganismos em geral e tem sido aplicado no estudo de diazotróficos simbióticos (Moreira et al., 1993; Dupuy, et al., 1994, Lajudie et al., 1994). No entanto, poucos trabalhos encontrados na literatura utilizaram esta técnica para caracterização de bactérias associativas diazotróficas (Santos et al., 2001). Além disso, não há trabalhos na literatura sobre caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de bactérias diazotróficas associativas isoladas de áreas de mineração de bauxita.

Ao avaliar a ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associativas em áreas de mineração de bauxita sob diferentes estádios de reabilitação, Melloni et al. (2004) verificaram densidades variando de $6,0 \times 10^3$ células g^{-1} solo a $5,7 \times 10^2$ células g^{-1} solo, utilizando o meio de cultivo NFb semi-sólido. Com os meios JNFb e Fam encontraram densidades de $3,6 \times 10^3$ células g^{-1} a $2,1 \times 10^3$ células g^{-1} de solo, $1,99 \times 10^4$ células g^{-1} a $1,7 \times 10^3$ células g^{-1} de solo, respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de setenta e dois isolados de bactérias associativas, obtidos destas culturas por caracterização fenotípica.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 72 isolados de bactérias diazotróficas estudados, oriundos de amostras de horizonte superficial de um Cambissolo distrófico, foram coletados de dez áreas da ALCOA Alumínio S/A, localizadas em Poços de Caldas (MG) (Quadro 1), e descritos detalhadamente em Melloni et al. (2004). O isolamento destas bactérias foi efetuado no laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA (Melloni et al., 2004), utilizando meios de cultura que favorecem o crescimento de diferentes diazotróficos: JNFb (*Herbaspirillum* spp.), NFb (*Azospirillum* spp.) e Fam (*Azospirillum amazonense*), cuja composição se encontra em Döbereiner et al. (1995) e Magalhães et al. (1983).

Quadro 1. Áreas e meios de cultivo de origem dos isolados de bactérias diazotróficas

Área em Poços de Caldas	Isolado
Campo	
Recém-minerado, coberto por braquiária (<i>Brachiaria decumbens</i>) e feijão-guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	UFLA 1 ^A , 2 ^A , 3 ^A , 28 ^B , 29 ^B , 30 ^B , 62 ^C , 66 ^C , 67 ^C , 69 ^C
Capim-azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) e <i>Eupatorium</i> sp. (Asteraceae)	UFLA 59 ^C , 63 ^C , 64 ^C
Capim-gordura (<i>Melinis minutiflora</i>), em sucessão. Presença de espécies nativas como bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>)	UFLA 6 ^A , 32 ^B , 33 ^B , 34 ^B , 35 ^B , 60 ^C , 61 ^C
Bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>) e sub-bosque bem desenvolvido (capim-gordura, alecrim)	UFLA 7 ^A , 8 ^A , 9 ^A , 10 ^A , 36 ^B , 54 ^C , 55 ^C , 56 ^C , 57 ^C , 58 ^C , 65 ^C , 68 ^C , 70 ^C
Referência com espécies graminóides e arbustivas (sem alteração antrópica)	UFLA 4 ^A , 5 ^A , 31 ^B
Serra	
Recém-minerado. Coberto por capim-gordura, feijão-guandu e espécies arbóreas nativas	UFLA 25 ^A , 26 ^A , 27 ^A , 48 ^B , 49 ^C , 50 ^C
Braquiária, feijão-guandu e espécies arbóreas nativas	UFLA 20 ^A , 21 ^A , 22 ^A , 23 ^A , 24 ^A , 44 ^B , 45 ^B , 46 ^B , 47 ^B , 71 ^C , 72 ^C
Espécies arbóreas nativas, sub-bosque desenvolvido, serapilheira adicionada	UFLA 11 ^A , 12 ^A , 13 ^A , 14 ^A , 15 ^A
Bracatinga e vegetação rasteira e arbustiva, processo de sucessão	UFLA 16 ^A , 17 ^A , 18 ^A , 19 ^A , 39 ^B , 40 ^B , 41 ^B , 42 ^B , 43 ^B , 51 ^C , 52 ^C , 53 ^C
Bracatinga e sub-bosque coberto por capim-gordura	UFLA 37 ^B , 38 ^B

^A Isolado obtido no meio de cultivo semi-sólido JNFb; ^B Isolado obtido no meio de cultivo semi-sólido NFb; ^C Isolado obtido no meio de cultivo semi-sólido Fam.

Todos os isolados cresceram formando película típica próxima à superfície do meio e foram capazes de redução do acetileno, indicativa da presença da nitrogenase (Dilworth, 1966). Os isolados foram, inicialmente, armazenados em meio de cultivo batata sólido com vaselina líquida a 2 °C. Em virtude das perdas de viabilidade de várias culturas no meio de cultivo batata, os isolados foram novamente caracterizados em meio de cultivo GNA e, a partir de julho de 2001, foram armazenados neste meio a 2 °C e, posteriormente, também em GN líquido com glicerol (1:1 V/V) a -80 °C. Em todos os testes, utilizaram-se para comparação sete estirpes tipo (T) e referência: BR11080^T (*Azospirillum lipoferum*), BR11340^T (*Burkholderia brasilensis*), KBC1^T (*Azospirillum irakense*), BR11175^T (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11001^T (*Azospirillum brasilense*) e BR11040^T (*Azospirillum amazonense*) e BR9004 (*Burkholderia* sp. isolada de nódulo de leguminosa arbórea). As estirpes de *Burkholderia* foram incluídas para comparação, pois foi relatado o isolamento deste gênero em meio similar ao meio JNFB utilizado neste estudo (Baldani, 1996).

Caracterização em meio de cultivo GNA e teste gram

Para a caracterização cultural em meio de cultivo GNA (caldo nutritivo Oxoid, 20 g L⁻¹, glicose, 5 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹ e pH 6,8) das estirpes e isolados que cresceram durante cinco dias a 27 °C, foram utilizadas as seguintes características culturais: tempo, em dias, para o aparecimento das colônias, diâmetro médio das colônias (mm), produção de goma (muita ou pouca), coloração das colônias (branca, rosa, rosa-claro, creme, creme-escuro, creme com centro escuro), consistência das colônias (mole, consistente, dura), forma e elevação de bordo (circular, irregular, puntiforme elevada, convexa, plana) e margem (inteira, ondeada, irregular).

Para o agrupamento das características culturais das bactérias, uma matriz binária dos dados originais (31 x 79) foi construída, compreendendo as variações das características dos setenta e dois isolados e das sete estirpes tipo/referência. Para cada variação das características foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência da característica. Os isolados e estirpes foram comparados com base em suas semelhanças, estimadas pelo coeficiente de Jacard, sendo o agrupamento destes realizado pelo método UPGMA (*average linkage clustering*) (Everitt, 1993). O método baseia-se na distância intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros de dois grupos, que foram representados graficamente por um dendrograma, obtido pelo programa NTSYS - pc, versão 2,0 t. (Rohlf, 2002).

Para o teste de Gram, os isolados cresceram durante cinco dias no meio de cultivo GNA sólido, quando então retirou-se com uma alça de platina uma porção das culturas para avaliação, segundo o método de Bartholowew.

Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultivo batata modificado

Estirpes e isolados de bactérias foram estudados quanto à tolerância a diferentes concentrações de NaCl em meio de cultivo batata sólido (Döbereiner et al., 1995). As estirpes e os isolados foram inoculados em 50 mL de meio de cultivo batata líquido e mantidos sob agitação orbital a 105 rpm a 27 °C. Após o crescimento destes por três dias (sendo este o tempo necessário para que atingissem a fase logarítmica), uma alíquota de 1 mL de cultura de cada estirpe/ isolado foi transferida para microtubo de 1,5 mL esterilizado e centrifugada a 8.000 rpm, a 25 °C, por 4 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 5,5 g L⁻¹) e centrifugadas novamente, repetindo-se o processo de lavagem das células por três vezes. Este processo objetivou remover os resíduos do meio de cultura do inóculo, que poderiam resultar num falso crescimento positivo.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL dessas suspensões de bactérias foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas que continham meio de cultivo batata, modificado por adição de soluções NaCl, com as seguintes concentrações finais: 0, 10, 20, 30, 50 e 80 g L⁻¹. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, com três repetições. Para avaliar a tolerância das bactérias ao NaCl, foi observada a presença ou ausência de crescimento no meio de cultura, após sete dias de incubação a 27 °C. Como não houve crescimento em algumas concentrações, o procedimento de lavagem das células para remoção de resíduos do meio revelou-se eficiente.

Características celulares em microscópio ótico

As estirpes e os 72 isolados de bactérias diazotróficas cresceram no meio de cultivo batata semi - sólido durante três dias a 27 °C. Em seguida, foi retirada uma alíquota de cada tubo para montagem das lâminas e observação em microscópio marca Olympus modelo B-max-40-III com sistema de contraste de fase e aumento de 1.800 vezes. As características observadas foram: motilidade celular (rápida, lenta, circular e trajetória), forma da célula (vibrião, bastonete e espirilos), formação de cadeias bacterianas (presença e ausência) e presença de grânulos de poli-β-hidroxibutirato. A largura celular de cada isolado foi aferida por meio de uma média de largura de cinco bactérias.

Proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após o crescimento das estirpes e isolados em meio de cultivo GNA sólido, inocularam-se colônias isoladas em 50 mL de meio de cultivo líquido TY. O crescimento se deu sob agitação constante de 120 rpm por quatro dias a 28 °C. Em seguida, o meio

com cada cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o “pelet” formado ressuspenso em tampão NaPBS, repetindo-se este processo por duas vezes, para lavagem das células. Do “pelet” celular lavado, 70 mg foram transferidos para microtubo, adicionando-se 0,9 mL do tampão da amostra (tampão de Laemmli) e 0,1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20 % para solubilização das proteínas. Esta mistura foi aquecida em banho-maria a 95 °C por 10 min. As amostras de proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, a 4 °C e 30 µL destas submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985). Para eletroforese, utilizou-se um gel de sistema descontínuo com concentração de poli-acrilamida a 12 %, para o gel separador, e a 5 %, para o gel de concentração.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 13 cadeias polipeptídicas (bandas mais fortes) representativas dos 79 padrões gerados. Para cada banda foram atribuídos valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência da matriz. Os padrões foram comparados por seu grau de similaridade estimado pelo coeficiente de Jacard (S_j), agrupados pelo método UPGMA (*average linkage clustering*) (Everitt, 1993) e representados graficamente por um dendrograma obtido pelo programa NTSYS-pc, versão 1.8. (Slice et al., 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização em meio de cultivo GNA e teste Gram

Todos os isolados apresentaram teste de Gram negativo. Foram observadas diferenças fenotípicas entre os isolados com relação a todas as características culturais avaliadas. A figura 1 mostra que a 81 % de similaridade formaram-se 12 grupos, compreendendo 38 isolados e duas estirpes. Os isolados UFLA 2, 5, 31, 6, 8 e 30 formaram o grupo A; UFLA 10 e 19, o grupo B; UFLA 14, 26 e 18, o grupo C; UFLA 62, 63, 64, 66, e 67, o grupo D; UFLA 12, 15, 23 e 17, o grupo E; UFLA 33 e 34, o grupo F; UFLA 21, 27 e 32, o grupo G. O grupo H foi formado por UFLA 11, 55, 56, 68 e 70; o grupo I, por UFLA 57, 58, 59, 60 e 69; o grupo J, pelas estirpes BR9004 e BR11340^T, e o grupo K, por UFLA 37, 39 e 53. Os demais 34 isolados e cinco estirpes não se agruparam e apresentaram alta dissimilaridade, indicando maior variação cultural entre estes e os demais.

Na figura 2, podem-se observar as características das colônias de isolados representativos dos principais grupos e das estirpes tipo. Não foi observada relação entre os grupos formados em meio GNA e a área de origem dos grupos isolados (Quadro 1), uma vez que vários grupos continham isolados de diferentes áreas. Os grupos formados em meio de cultivo GNA também não tiveram relação com os grupos encontrados por Melloni et al. (2004) em meio de cultivo batata.

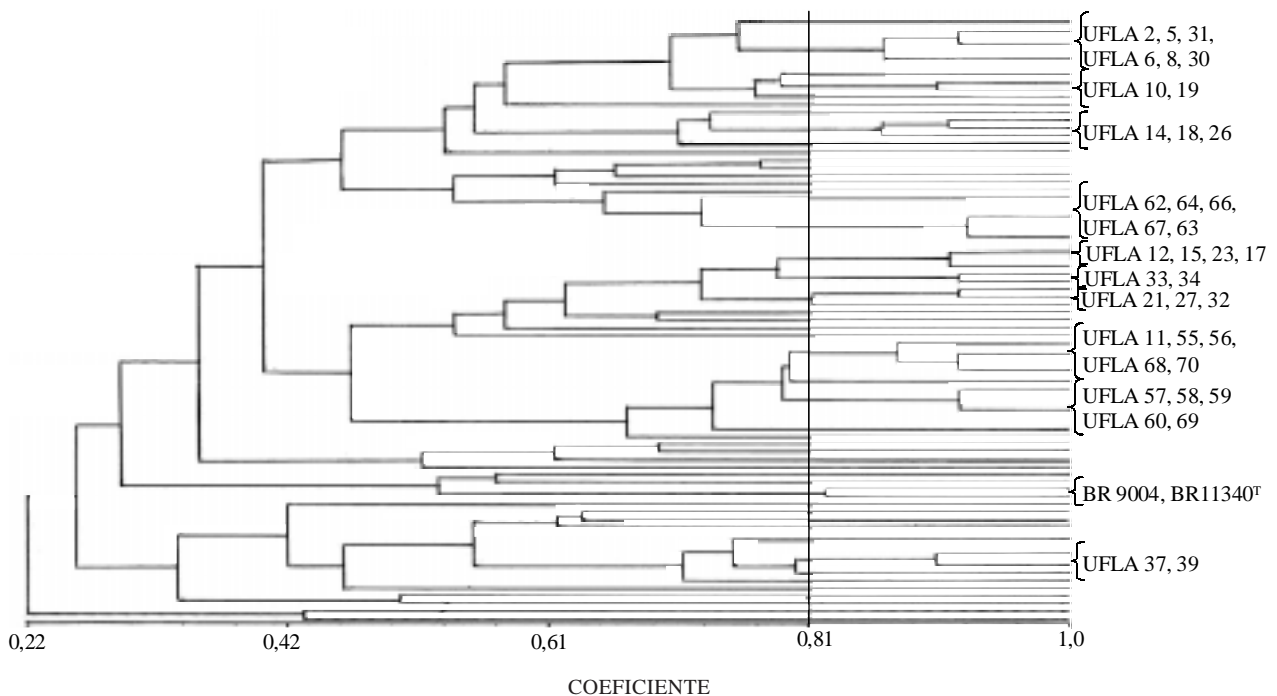


Figura 1. Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características culturais de bactérias diazotróficas isoladas em amostras de solos de áreas reabilitadas de mineração e as estirpes tipo BR11001^T, BR11080^T, BR11040^T, BR9004, BR11340^T, BR11175^T, KBC1^T.

Tolerância de bactérias diazotróficas à salinidade em meio de cultivo batata modificado

As concentrações máximas toleradas (CMT) por isolado e estirpe de bactéria diazotrófica cultivados em meio de cultivo batata, suplementado com diferentes concentrações de NaCl, encontram-se no quadro 2. Estes foram separados em cinco grupos com CMT variando de 0 a 50 g L⁻¹. Nenhum isolado e estirpe cresceu em meio de cultivo com 80 g L⁻¹ de NaCl.

Alguns grupos de isolados, obtidos com base na similaridade de características culturais, relacionaram-se com os grupos de tolerância ao estresse salino. Os membros do grupo A, UFLA 5, 6, 8, 30 e 31 apresentaram CMT de 30 g L⁻¹ de NaCl, com exceção de UFLA 2 que teve CMT de 20 g L⁻¹. Todos os isolados do grupo B e C apresentaram CMT de 30 g L⁻¹ de NaCl, com exceção de UFLA 19. O grupo D não tolerou nenhuma concentração de NaCl. Já o grupo E apresentou variações quanto a CMT: UFLA 12 e 15 toleraram 20 g L⁻¹ de NaCl, UFLA 23, 30 g L⁻¹ e UFLA 17, 50 g L⁻¹. Todos os isolados dos grupos F e G tiveram CMT de 20 g L⁻¹ de NaCl, com exceção de UFLA 27. Os isolados do grupo H apresentaram variações de tolerância: UFLA 11, 30 g L⁻¹; UFLA 55, 56 e 70, 10 g L⁻¹ e UFLA 68 não tolerou qualquer concentração de NaCl. Do grupo I, UFLA 58, 59, 60 e 69 tiveram CMT de 10 g L⁻¹ e UFLA 57 não tolerou qualquer estresse salino. Os representantes do grupo J, BR9004 e BR11340^T, toleraram 20 g L⁻¹. Os isolados do grupo K também variaram com relação a CMT: UFLA 37, 10 g L⁻¹; UFLA 39, 30 g L⁻¹ e UFLA 53, 20 g L⁻¹. Não foi observada relação de tolerância à salinidade com a origem (áreas submetidas aos diferentes métodos de reabilitação – Quadro 1) dos isolados.

Quadro 2. Concentrações máximas toleradas (CMT) de NaCl em meio de cultivo batata modificado por estirpes e isolados de bactérias diazotróficas

CMT	Isolado/estirpe
g L ⁻¹	
0	UFLA 27, 50, 51, 52, 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68
10	UFLA 37, 42, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 69, 70, BR11040 ^T
20	UFLA 1, 2, 12, 15, 19, 20, 21, 22, 25, 29, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 44, 46, 48, 53, 71, 72, BR11080 ^T , BR9004, BR11340 ^T
30	UFLA 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 35, 39, 41, 43, 45, 47, 49, BR11175 ^T , BR11001 ^T
50	UFLA 17, KBC1 ^T

A espécie *Azospirillum irakense* (KBC1^T), isolada de raízes de arroz na região subtropical do Iraque (Khammas et al., 1989), é relatada como tolerante a até 3 % de NaCl. No presente estudo, KBC1^T tolerou 5 % de NaCl. O isolado UFLA 17, oriundo da área de Serra reabilitada com bracinga e vegetação rasteira e arbustiva em processo de sucessão, também apresentou a mesma tolerância de KBC1^T. Foi relatado que a estirpe tipo de *Burkholderia brasilensis* tolera até 1 % de NaCl em meio de cultivo semi - sólido específico (Baldani, 1996), mas, neste trabalho, esta tolerou 2 % de NaCl em meio batata sólido. A discrepância entre os resultados deste e de outros trabalhos provavelmente deveu-se à utilização de meios com composições químicas distintas que podem tanto interferir na disponibilidade do sal quanto favorecer o crescimento das bactérias.

A tolerância ao NaCl foi avaliada, visando ao agrupamento fisiológico dos isolados e também por ser utilizada na caracterização de espécies bacterianas. Bactérias Gram-negativas apresentam como componente principal da parede celular um complexo de lipopolissacarídeos, muito importante tanto para a manutenção da estabilidade da membrana celular, quanto para o controle parcial de entrada e saída de algumas substâncias da célula para o meio, ou vice-versa (Luderitz et al., 1982).

Estudos realizados por Jofré et al. (1998a,b) evidenciaram que a capacidade de *Azospirillum brasilense* (Gram-negativo) tolerar o estresse salino pode estar associada a uma alteração na produção de lipopolissacarídeos, que confere diferenças morfológicas na parede celular do microssimbionte. Essas diferenças foram evidenciadas pela diminuição e até pelo desaparecimento da membrana celular externa no tratamento com 300 mmol L⁻¹ de NaCl que, além de ter causado um decréscimo de 66 % no crescimento do microrganismo, também interferiu na capacidade deste em colonizar os hospedeiros milho e trigo.

Vale ainda destacar que Bashan & Holguin (1997) inferiram que, quanto maior for a capacidade de *Azospirillum* em tolerar o estresse salino, maior será o acúmulo de solutos orgânicos e mais espessa será a camada de lipopolissacarídeos envolvendo a bactéria, fato este que pode ser estendido a outras bactérias Gram-negativas como as aqui estudadas. É interessante notar que os isolados que apresentaram as menores colônias (diâmetro ≤ 1,0 mm) e muito pouca produção de goma em relação aos demais, no meio sem NaCl, foram todos não tolerantes ou pouco tolerantes (CMT de 0 e 10 g L⁻¹).

Características celulares em microscópio ótico

A caracterização celular dos isolados e estirpes tipo encontram-se no quadro 3. Na figura 2, encontram-se fotomicrografias das células de

isolados representativos dos grupos formados e das estirpes tipo e referência. A largura das células variou de 0,61 a 1,21 µm (Quadro 3). A presença de poli-β-hidroxi-butirato somente pôde ser detectada nas células de forma vibríão que apresentaram maior diâmetro. Nas demais, não foi possível visualizar tais inclusões, considerando o equipamento. A estirpe tipo *A. lipoferum* BR11080^T apresentou forma de vibríão, não formou cadeias, teve inclusões de poli-β-hidroxi-butirato, motilidade giratória rápida e ondulatória e largura celular variando de 1,18 a 1,20 µm.

Os isolados que apresentaram as mesmas características desta estirpe foram: UFLA 2, 15, 22, 25, 27, 29, 35, 37, 39, 43, 44, 45, e 48. A estirpe tipo *A. brasilense* BR11001^T apresentou características semelhantes às da estirpe tipo *A. lipoferum* BR11080^T, com exceção da largura celular, que foi de 0,95 a 0,98 µm. Os isolados que se agruparam com esta estirpe foram: UFLA 12, 34, 38, 40, 46, 53 e 72, que apresentaram largura celular de 0,95 a 1,09 µm. Os isolados UFLA 1, 32 e 42 apresentaram forma de vibríão, grânulos de poli-β-hidroxi-butirato, não formaram cadeias e tiveram motilidade rápida

Quadro 3. Características em microscópio ótico das células de isolados de bactérias diazotróficas em meio de cultivo batata semi-sólido

Isolado	Largura	Forma ⁽¹⁾	Motilidade ⁽²⁾	Isolado	Largura	Forma ⁽¹⁾	Motilidade ⁽²⁾
	µm				µm		
UFLA1	0,94	Vibrião /NC	GR/O	UFLA40	0,99	Vibrião /NC	GR/O
UFLA2	1,20	Vibrião /NC	GR/O	UFLA41	0,61	Bastonete /NC	R/T
UFLA3	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA42	0,91	Vibrião /NC	GR/O
UFLA4	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA43	1,18	Vibrião /NC	GR/O
UFLA5	0,61	Bastonete. Cur/NC	R/T	UFLA44	1,18	Vibrião /NC	GR/O
UFLA6	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA45	1,18	Vibrião /NC	GR/O
UFLA7	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA46	1,06	Vibrião /NC	GR/O
UFLA8	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA47	nd ⁽³⁾	-	-
UFLA9	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA48	1,21	Vibrião /C	GR/O
UFLA10	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA49	nd ⁽³⁾	-	-
UFLA11	0,91	Bastonete	T/T	UFLA50	nd ⁽³⁾	-	-
UFLA12	0,99	Vibrião /NC	GR/O	UFLA51	0,82	Bastonete C	L/Tre
UFLA13	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA52	0,91	Bastonete C	T
UFLA14	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA53	0,99	Vibrião /NC	GR/O
UFLA15	1,20	Vibrião /NC	GR/O	UFLA54	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA16	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA55	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA17	0,72	Bastonete	T/Tre	UFLA56	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA18	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA57	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA19	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA58	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA20	0,91	Vibrião /C	GR/O	UFLA59	nd ⁽³⁾	-	-
UFLA21	nd ⁽³⁾	-	-	UFLA60	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA22	1,18	Vibrião /NC	GR/O	UFLA61	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA23	nd ⁽³⁾	-	-	UFLA62	0,88	Bastonete C/A	L/Tre
UFLA24	0,88	Bastonete /C	L/Tre	UFLA63	0,88	Bastonete C	L/Tre
UFLA25	1,20	Vibrião /NC	GR/O	UFLA64	0,88	Bastonete C	L/Tre
UFLA26	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA65	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA27	1,21	Vibrião /NC	GR/O	UFLA66	0,85	Bastonete C	L/Tre
UFLA28	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA67	0,89	Bastonete C/A	L/Tre
UFLA29	1,18	Vibrião /NC	GR/O	UFLA68	0,79	Bastonete C	L/Tre
UFLA30	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA69	0,79	Bastonete C	L/Tre
UFLA31	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T	UFLA70	0,91	Bastonete C/A	L
UFLA32	0,91	Vibrião /NC	GR/O	UFLA71	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T
UFLA33	nd ⁽³⁾	-	-	UFLA72	0,95	Vibrião /NC	GR/O
UFLA34	1,09	Vibrião /NC	GR/O	BR 9004	0,61	Bastonete/NC	R/T
UFLA35	1,19	Vibrião /C	GR/O	BR11175 ^T	0,61	Bastonete Cur/NC	R/T
UFLA36	0,61	Bastonete /C	R/T	BR11080 ^T	1,20	Vibrião /NC	GR/O
UFLA37	1,18	Vibrião /NC	GR/O	BR11040 ^T	0,70	Vibrião /C	GR/O
UFLA38	0,95	Vibrião /NC	GR/O	BR11001 ^T	0,98	Vibrião /NC	GR/O
UFLA39	1,19	Vibrião /NC	GR/O	KBC1 ^T	0,61	Vibrião /C	GR/O
				BR11340 ^T	0,82	Bastonete C	L/Tre

⁽¹⁾ Vibrião, bastonete curvo (Cur), bastonete curto (C) e bastonete. ⁽²⁾ Características observadas: giratória rápida e ondulatória (GR/O), rápida e trajetória (R/T), trajetória trêmula (T/Tre), lenta e trêmula (L/Tre), lenta (L) e trêmula (Tre). Presença e ausência de cadeias bacterianas /(C) e /(NC), respectivamente. (A): formação de agregação. ⁽³⁾ Não determinado.

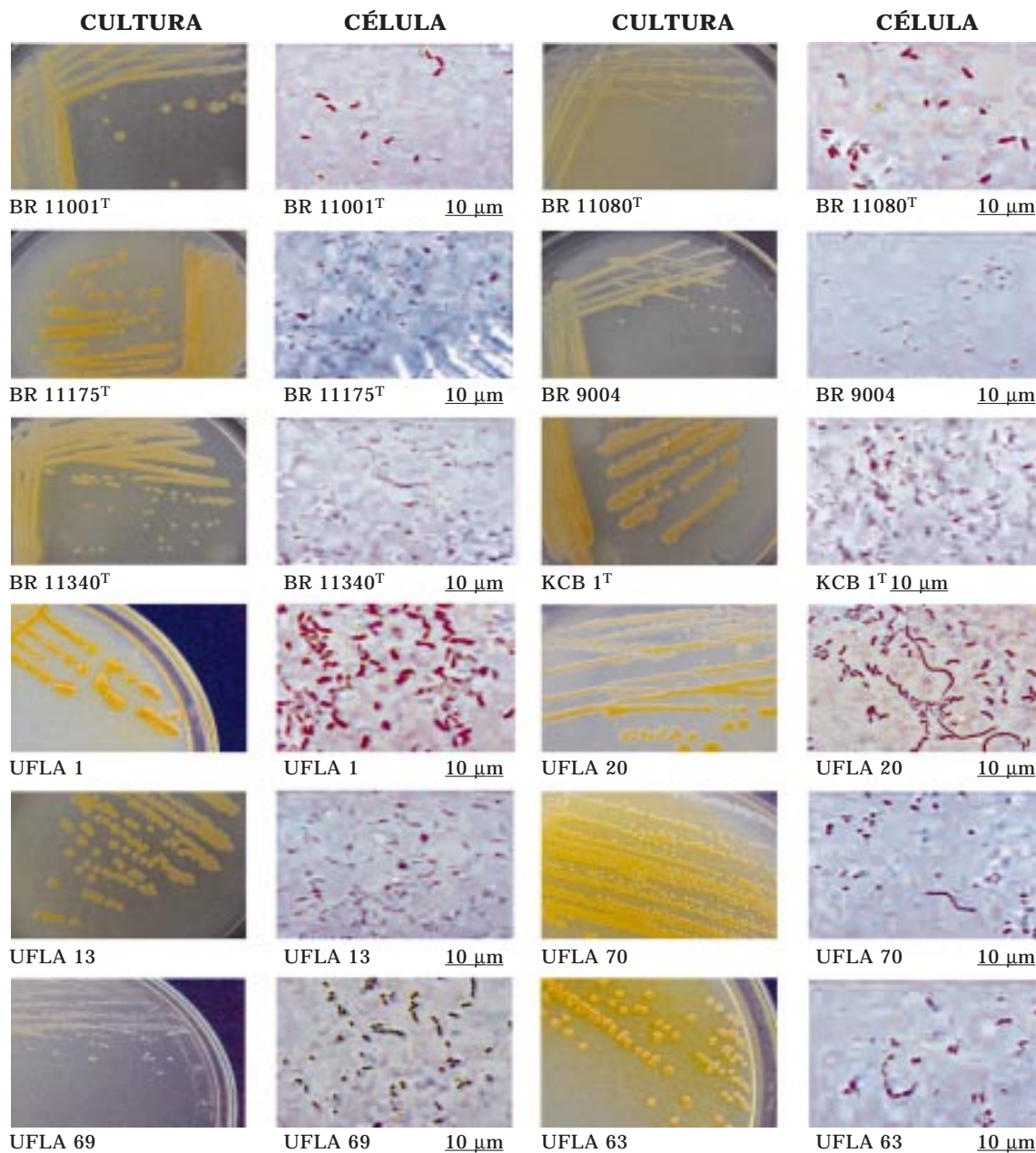


Figura 2. Aspectos morfológicos de colônias e de células de estirpe tipo e isolados representativos dos diferentes grupos encontrados em áreas reabilitadas após a mineração de bauxita em Poços de Caldas.

classificada como giratória e ondulatória típica do gênero *Azospirillum*, com largura variando de 0,91 a 0,94 μm, mas não se agruparam com as estirpes tipo deste gênero. O isolado UFLA 20 apresentou formação de uma estrutura em forma de cadeia sem septos e extensa. As estirpes tipo *A. irakense* KBC1^T e *A. amazonense* BR11040^T apresentaram forma de vibrião, poli-β-hidroxibutirato, cadeias, motilidade giratória ondulatória rápida e largura celular de 0,61 e 0,70 μm, respectivamente, não tendo nenhum isolado se agrupado com estes. A estirpe *Burkholderia* sp. BR9004 apresentou forma de bastonete, não formou cadeia, teve motilidade

classificada com trajetória rápida e largura celular de 0,61 μm. O isolado que se assemelhou a ela foi o UFLA 36. A estirpe tipo *H. seropedicae* BR11175^T apresentou características semelhantes às da estirpe tipo BR9004, variando somente na forma celular, caracterizada como bastonete curvo com largura celular 0,61 μm. Os isolados que se agruparam a BR11175^T foram: UFLA 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 26, 28, 30, 31, 41 e 71. *B. brasiliensis* BR11340^T apresentou forma de bastonete, formação de cadeia, motilidade giratória lenta/trêmula, e largura celular variando de 0,79 a 0,89 μm. Os isolados que se agruparam a esta estirpe foram:

UFLA 24, 51, 62, 63, 64, 66 e 67. Os isolados UFLA 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 65 e 70 tiveram largura 0,91 µm, apresentaram forma de bastonete curto que se agregavam e motilidade lenta. Os isolados UFLA 68 e 69 tiveram 0,79 µm de largura celular, forma de bastonete curto e motilidade lenta/trêmula. Os isolados UFLA 11, 17 e 52, que apresentaram forma de bastonete pequeno e motilidade trêmula, não se agruparam com nenhuma estirpe tipo e referência.

As bactérias apresentam dimensões extremamente reduzidas, que variam entre espécies e pouco variáveis intra-espécies. Esta informação é uma ferramenta auxiliar em estudos de diversidade e caracterização microbiana, pois permite agrupar e conhecer melhor os microrganismos; além disso, o diâmetro celular é uma característica importante na descrição de novas espécies. Esta caracterização possibilitou discriminar os isolados em nove grupos e quatro isolados distintos destes grupos, e estes diferiram na largura celular em relação a estirpes tipo e referência usados para comparação.

Proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foram formados oito grupos estirpes de padrão protéico similar (Figura 3). Estes continham os seguintes isolados/estirpes de acordo com Nóbrega (2002): grupo I - UFLA 12, 23 e BR11080^T (*A. lipoferum*); grupo II - BR11040^T (*A. amazonense*); grupo III- UFLA 7, 14, e 71; grupo IV- UFLA 62, 63 e 64; grupo V- UFLA 67 e 69; grupo VI- UFLA 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 16, 18, 19, 21, 24, 26, 28, 30, 31 e 41. O grupo VII- UFLA 15, 27, 32, 33, 34, 35, 42, 46, 47 e

48, e grupo VIII- BR11001^T (*A. brasilense*), UFLA 1, 22, 29, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 49 e 72. Já os isolados UFLA 13, 17 e 25 não se agruparam com os demais. O perfil protéico dos seguintes isolados não foi revelado no gel: 11, 36, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 68 e 70, indicando que o método usado deve ser modificado para estes.

Verifica-se que UFLA 20 e BR11001^T apresentaram 100 % de similaridade. Os isolados UFLA 19, oriundos do ecossistema Serra, reabilitado com bracatinga apresentando vegetação rasteira sob processo de sucessão, e UFLA 13, do ecossistema Serra reabilitado com espécies arbóreas nativas, sub-bosque desenvolvido e adição de serapilheira, foram 82 % similares à estirpe tipo BR11175^T. UFLA 52, isolado do ecossistema Serra, reabilitado com bracatinga e sob processo de sucessão, e a BR11080^T se agruparam a 64 % de similaridade. UFLA 2, isolado do ecossistema Campo, reabilitado com braquiária e guandu, e UFLA 42, isolado do ecossistema Serra, reabilitado com bracatinga em processo de sucessão, foram agrupados a 60 % de similaridade. As estirpes BR11340^T, BR11040^T, BR9004, KBC1^T e os demais representantes dos grupos protéicos, UFLA 17, 25, 63, 69 e 71, apresentaram similaridade menor que 50 % em relação aos demais.

Nenhum dos 72 isolados se assemelhou com *A. amazonense*, porém muitos isolados com características culturais semelhantes a esta espécie foram obtidos, mas perdidos com as sucessivas repicagens em meio de cultura batata.

O método de SDS-PAGE de proteínas totais tem sido amplamente utilizado como "screening" para diversidade de rizóbio. Vários autores (Moreira et

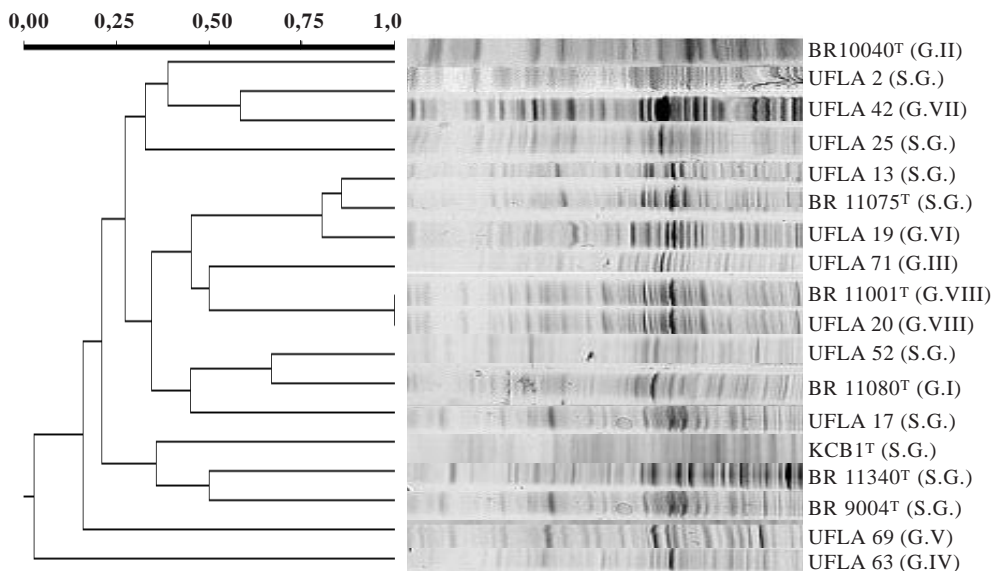


Figura 3. Dendrograma de similaridade construído com base nos perfis protéicos dos representantes dos isolados de bactérias diazotróficas e das estirpes tipo. SG: isolado sem grupo. G: isolado agrupado.

al., 1993; Dupuy et al., 1994; Lajudie et al., 1994; Moreira et al., 2000) que empregaram este método identificaram novas espécies de rizóbio. Além disso, Vandamme et al. (1990), Kampfer, (1995) e Vandamme et al. (1997) demonstraram haver alta correlação entre resultados de hibridização DNA:DNA e do perfil eletroforético de proteínas. Neste contexto, a alta dissimilaridade da maioria dos isolados em relação a estirpes tipo e referência, principalmente com relação aos padrões eletroforéticos de proteína total, admite a presença de novas espécies entre esses.

A maioria dos isolados apresentou diferenças em suas características culturais, tolerância ao NaCl, características celulares e padrões de proteína total, em relação às estirpes tipo e referência das espécies de bactérias diazotróficas associativas utilizadas neste estudo, cujo crescimento é relatado como sendo favorecido nos meios utilizados. Assim, corroborando resultados de outros trabalhos (Magalhães & Döbereiner, 1984; Baldani, 1996), verifica-se que os meios NFb, Fam e JNFb permitem o isolamento de outras espécies diazotróficas associativas, além das espécies alvo.

As bactérias diazotróficas associativas encontradas nas áreas em processo de reabilitação, após a mineração da bauxita, podem ter sido introduzidas por sementes das espécies plantadas ou por outros agentes (e.g. vento, animais) que contribuíram para a disseminação dos diazotróficos nestas áreas. Todavia, sua sobrevivência e multiplicação dependeram de condições favoráveis do solo e da nova vegetação. Caso estas bactérias sejam componentes da população nativa, elas foram resilientes ao processo de mineração. Neste caso, é possível que o armazenamento do solo fértil, antes do início da atividade de mineração, tenha contribuído para a sobrevivência das bactérias diazotróficas preexistentes.

Assim, com a posterior utilização deste substrato na recomposição da área degradada e a revegetação com capim - gordura, azevém e braquiária, que são hospedeiros destes diazotróficos, houve favorecimento da sua sobrevivência e multiplicação. De fato, Melloni et al. (2004) relataram maiores densidades de diazotróficos associativos nas áreas reabilitadas com gramíneas. Portanto, a alta diversidade encontrada nas áreas, seja exótica seja nativa, revela o sucesso das práticas de reabilitação. Como estes organismos são mediadores da FBN, um processo vital para os ecossistemas, eles podem estar contribuindo para sua sustentabilidade.

CONCLUSÕES

1. Os isolados de bactérias diazotróficas, oriundos de áreas de mineração de bauxita reabilitadas, apresentaram alta diversidade fenotípica.

2. Não houve relação entre os grupos formados pelas várias características estudadas e nem destes com as áreas de origem dos isolados.

3. Os meios de cultivo NFb, Fam e JNFb que favoreceram, respectivamente *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* s, *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp., permitiram isolamento de representantes de outras espécies.

4. A alta dissimilaridade da maioria dos isolados em relação a estirpes tipo, principalmente com relação aos padrões eletroforéticos de proteína total, indicou a possibilidade da presença de novas espécies entre eles.

LITERATURA CITADA

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Itaguai, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 234p. (Tese de Doutorado)
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. Pesq. Agropec. Bras., 32:627-639, 1997.
- BALLOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. & SCHLEIFER, K., eds. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, application. 2.ed. New York, Spring-Verlang, 1991. v.1.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol., 43:103-121, 1997.
- DICELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. Appl. Environ. Microbiol., 63:4485-4493, 1997.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen – fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta, 127:285-294, 1966.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis, 13:1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária, Seropédica, Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa Agrobiologia, 1995. 60p.

- DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; COLLINS, M.D. & GILLIS, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol., 44:461-473, 1994.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M. & HARTMANN, A. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51:17-26, 2001.
- EVERITT, B.S. Cluster analysis. New York, John Wiley & Sons, 1993. 170p.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M. & MINNIKIN, D., eds. Chemical methods in bacterial systematics. London, Academic Press, 1985. p.119-129.
- JOFRÉ, E.; FISCHER, S.; RIVAROLA, V.; BALEGNO, H. & MORI, G. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheats roots. Can. J. Microbiol., 44:929-936, 1998a.
- JOFRÉ, E.; RIVAROLA, V.; BALEGNO, H. & MORI, G. Differential gene expression in *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. Can. J. Microbiol., 44:929-936, 1998b.
- KAMPFER, P. Differentiation of *Brevibacterium* species by electrophoretic protein-patterns. Syst. Appl. Microbiol., 17:533-535, 1995.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D. & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol., 140:679-693, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 27:680-685, 1970.
- LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K. & GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melilot* com. nov.; *Sinorhizobium sahelii* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga*, sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 44:715-733, 1994.
- LUDERITZ, O.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C.; LEHMANN, V.; RIETSCHEL, E. & SHAW, D. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. Current topics in membranes and transport. New York, Academic Press, 1982. v.17.
- MAGALHÃES, F.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. R. Microbiol., 15:246-252, 1984.
- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. Ann. Acad. Bras. Ci., 55:417-430, 1983.
- MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. R. Bras. Ci. Solo, 28:85-93, 2004.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K. & FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Syst. Appl. Microbiol., 16:135-146, 1993.
- MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, Y.; GONÇALVES, M.; HAUKKA, K.; YOUNG, P.J.W.; FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; CRUZ, L.M. & PEDROSA, F.O. *Azorhizobium johannense* sp.nov. and *Sesbania virgata* (CAZ.) PERS. a highly specific symbiosis. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: From Molecules to Crop Productivity. London, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.197.
- MOREIRA, F.S.M. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica dos solos. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 626p.
- NÓBREGA, R.S.A. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 71p. (Tese de Mestrado)
- RADEMAKER, J.L.W. & BRUIJIN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: GAETANO-ANOLÉS, G. & GRESSHOFF, P.M., eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York, John Wiley, 1997. p.1-26.
- ROHLF, F.J. NTSYSpc - Numerical taxonomy system: versão 2.0, 2002.
- SANTOS, P.E.L.; CRISTALES, R.B. & MELLADO, J.C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol., 67:2790-2798, 2001.
- SLICE, D.E.; KIM, J. & WALKER, J. NTSYS - Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.8, 1994.
- SILVA, G.P. Caracterização química, física e mineralógica de materiais provenientes da mineração de ferro e comportamento de plantas para sua revegetação. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 76p. (Tese de Mestrado)
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília, Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária, 1994. 142p.
- VANDAMME, P.; VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K. & De LEY, J. Intra-and interspecific relationships of veterinary *Campylobacters* revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. Syst. Appl. Microbiol., 13:295-303, 1990.
- VANDAMME, P.; VANDOORN, L.J.; ALRASHID, S.T.; QUINT, W.G.V.; VANDERPLAS, J.; CHAN, V.L. & ON, S.L.W. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron & Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int. J. Syst. Bacteriol., 47:1055-1060, 1997.
- WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. Braz. J. Microbiol., 32:201-205, 2001.

