

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM *POACEAE*

BARBOSA, Julierme Zimmer^{*}; CONSALTER, Rangel^{*}; VARGAS MOTTA, Antonio Carlos^{**}

Resumo

O nitrogênio (N), em razão de suas funções no metabolismo das plantas, é o nutriente que mais limita a produção vegetal. Está presente em grandes quantidades na atmosfera, principalmente como di-nitrogênio; porém, a maioria dos organismos não é capaz de utilizar diretamente o nutriente nessa forma, necessitando que este seja fixado na forma de amônia. No solo, o N fixado é transformado em nitrato por meio do processo de nitrificação (mediado pelas bactérias *Nitrossomonas* sp. e *Nitrobacter* sp.), assim passa a ser disponível para as plantas. A fixação de N pode ocorrer por via atmosférica, biológica e industrial; a última foi e ainda é um dos pilares na construção e manutenção da agricultura moderna. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) apresenta vantagens econômicas e ambientais, caracterizando-se como uma ferramenta importante na obtenção de uma produção vegetal sustentável. Plantas da família *Fabaceae* (fabáceas) têm a eficiência no processo de FBN conhecida e consagrada, porém, as quatro culturas mais produzidas no mundo (cana-de-açúcar, milho, arroz e trigo) são da família *Poaceae* (poáceas), e a exploração da FBN nestas plantas é uma possibilidade recente; a otimização desse processo pode trazer benefícios significativos, visto que plantas dessa família são de suma importância na produção de alimentos, fibra e energia. Com base no exposto, essa revisão sintetiza conhecimentos no que se refere o processo e à eficiência das bactérias diazotróficas não nodulíferas em *Poaceae*, com o objetivo de avaliar o estado da ciência da FBN nesta família de plantas. Palavras-chave: Bactérias diazotróficas. Rizosfera. Endofítico, Produção vegetal.

Biological nitrogen fixation in grass

Abstract

Nitrogen (N) due to their role in plant metabolism is the nutrient that most limits crop production. It is present in large quantities in air, primarily as di-nitrogen, but unfortunately the plants are not able to

^{*} Engenheiro Agrônomo; Mestrando em Ciências do Solo pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba; barbosajz@yahoo.com.br; rangelconsalter@hotmail.com.br

^{**} Engenheiro Agrônomo; Doutorado em Agronomia e Solos; Professor do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, mottaacv@ufpr.br

directly use the nutrient in that form, requiring it to be fixed in the form of ammonia. In soil, the fixed N is converted to nitrate by nitrification process (mediated by Nitrosomonas sp. and Nitrobacter sp. bacteria), thus becomes available for plants. The N fixation may occur via atmospheric, biological and industrial, and the last was and still is a pillar in the construction and maintenance of modern agriculture. The biological nitrogen fixation (BNF) provides economic and environmental advantages, being characterized as an important tool in achieving a more sustainable crop production. Plants of the family Fabaceae (legumes) has the efficiency in the process of BNF known and consecrated, however, four more crops produced in the world (sugar cane, corn, rice and wheat) are of the family Poaceae (grass), and exploitation of BNF in plants of this family is a recent possibility, with relatively low efficiency, however, the optimization of these processes can bring significant benefits, since plants of this family are of paramount importance in producing food, fiber and energy. Based on the above, this review summarizes knowledge regarding the process and efficiency of non-nodulating diazotrophs in Poaceae, in order to assess the state of the science of BNF this plants family.

Keywords: Diazotrophic bacteria. Rhizosphere. Endophytic. Crop production.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o nutriente exigido em maior quantidade nas plantas cultivadas, com poucas exceções, representa cerca de 2 a 5 % da matéria seca vegetal. Isso denota a sua importância para o metabolismo das plantas; é constituinte de enzimas, proteínas, DNA, RNA, clorofilas e precursor de hormônios (MALAVOLTA; MORAES, 2007, p. 210). Dessa maneira, é o nutriente que mais limita a produção vegetal.

O processo pelo qual o N circula mediante compartimentos terrestres, como solo, micro-organismos, plantas, animais, matéria orgânica do solo, recursos hídricos e ar, é chamado de ciclo do N. Dentro deste ciclo a atmosfera representa o reservatório principal, visto que tem aproximadamente 78% de N, principalmente como di-nitrogênio (N_2), que, em decorrência da força de ligação entre os átomos da molécula, é uma forma inerte para a maioria dos seres vivos (REIS et al., 2006 p. 156). Para que o N atmosférico seja disponibilizado para a biosfera, é necessário que a ligação tripla entre os dois átomos de N seja quebrada e o N_2 seja reduzido, à amônia (NH_3), processo denominado de fixação, que pode ocorrer por meio atmosférico, industrial e biológico (VITTI; HEIRINCHS, 2007, p. 113; HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008, p. 2).

A fixação por via atmosférica ocorre pela ação de raios e relâmpagos, que em razão da elevada energia, separa os átomos de N da molécula de N_2 . Assim, o N se liga como oxigênio presente na atmosfera, formando óxidos de N, transportados para os ecossistemas terrestres juntamente com a água da chuva (LORENZ, 2009, p. 296).

O meio industrial é um processo com alto custo energético, que se utiliza de altas temperaturas e pressão para realizar a fixação. Envolve combustíveis fósseis, como gás natural e petróleo (VITTI; HEIRINCHS, 2007, p. 113); apesar de tudo foi por meio desta que a agricultura moderna se desenvolveu, juntamente com a aplicação de outros fertilizantes, corretivos, melhoramento genético de plantas, e com o uso de máquinas (PARAYIL, 2003, p. 974; SPIERTZ, 2010, p. 43).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é levada a cabo por micro-organismos edáficos que podem ou não formar associações com vegetais. Pela capacidade que possuem de fixar N atmosférico, são denominados diazotróficos. Possuem esta capacidade em virtude da presença do complexo enzimático nitrogenase, uma metaloenzima que cataliza a conversão de N_2 à NH_3 a temperatura e pressão ambientes, utilizando-se de energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (REIS et al., 2006 p. 156; REIS; TEIXEIRA, 2006, p. 152; HOFFMAN; DEAN; SEEFELDT, 2009, p. 610).

O sistema radicular tem como funções básicas absorver água e nutrientes e ancorar a planta, entretanto, associado a estas, ocorre a liberação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos, alterando os atributos físicos, químicos e biológicos da rizosfera (HINSINGER et al., 2009, p. 117). Estes compostos podem atrair ou servir de substrato metabólico para as bactérias do solo, assim, são registradas altas populações na rizosfera e no rizoplano, na ordem de 10^7 - 10^9 e 10^5 - 10^7 unidades formadoras de colônias por grama de solo ou tecido fresco (UFC g^{-1}), respectivamente (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001, p. 557). Contudo, a rizosfera é um *habitat* ecologicamente complexo, com diversos inimigos naturais das bactérias, portanto, a capacidade destas em colonizar rizosfera e rizoplano depende de fatores como: produção de substâncias antibióticas, eficiência na utilização de substratos orgânicos, atração por rizodepósitos e taxa de crescimento da população bacteriana (WHIPPS, 2001, p. 487).

A principal forma de absorção de N pelas plantas é o nitrato e a amônia; em solos bem drenados é convertida a nitrito por bactérias do gênero *Nitrossomonas sp.* e o nitrito passa a nitrato graças à ação de bactérias do gênero *Nitrobacter sp.*; esse processo é chamado de nitrificação. O nitrato é então absorvido. Em solos inundados ou em sítios com maior umidade em solos bem drenados, a carência em oxigênio proporciona a desnitrificação, na qual algumas espécies de bactérias utilizam nitrato em vez do oxigênio na respiração, promovendo a perda de N para a atmosfera como N_2 ou óxido nitroso (N_2O) (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010, p. 193). Assim, em condições de baixa disponibilidade de N no solo a atividade de bactérias fixadoras passa a ser muito importante.

Não obstante, o N aplicado via fertilizante não é totalmente aproveitado pelas plantas, em razão de ser um elemento que sofre diversos tipos de transformações, com perdas irreversíveis e reversíveis. A ureia, principal fonte de adubação nitrogenada utilizada na agricultura, quando aplicada na superfície do solo, sofre hidrólise enzimática, formando o gás amônia (NH_3), que pode ser perdido para a atmosfera por volatilização (DA ROS; AITA; GIACOMINI, 2005, p. 799).

Como a maioria dos constituintes da matriz dos solos apresenta predominância de cargas negativas, o N aplicado ou que se transforma em NO_3^- , pode ser lixiviado para além da zona de absorção das raízes, considerando a sua baixa energia de ligação no solo (CRUSIOL et al., 2011, p. 1980). Ainda, o N pode ser imobilizado, por causa de sua incorporação na estrutura de outros organismos, sobretudo microrganismos (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010, p. 192).

Todavia, as perdas não se limitam ao prejuízo econômico, também podem proporcionar a contaminação do ambiente, nesse sentido, grande é a preocupação com o teor de NO_3^- nas fontes de água (SPIERTZ, 2010, p. 43). O excesso de NO_3^- favorece o crescimento de bactérias que podem produzir substâncias tóxicas para os humanos, além disso, o NO_3^- em alta quantidade na água prejudica a saúde dos seus consumidores, sendo atribuídas a este diversas síndromes e até mesmo indução à produção de substâncias carcinogênicas (DAVIDSON et al., 2012, p. 8).

Diante da complexidade acerca do manejo da adubação nitrogenada e de seu impacto econômico e ambiental, a FBN é vista como uma ferramenta importante para uma produção vegetal

mais sustentável (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008, p. 2; HUNGRIA, 2011, p. 17). A aplicação na agricultura da FBN em plantas da família *Fabaceae* (fabáceas), por meio da inoculação de estirpes selecionadas de bactérias, é utilizada extensivamente em culturas como soja, amendoim, ervilha e alfafa. Na soja a eficiência do processo é tão alta (cerca de 176 kg ha⁻¹) que esta leguminosa pode ser cultivada praticamente sem adição de fertilizantes nitrogenados (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008, p. 10).

Porém, entre as culturas mais produzidas no mundo, as quatro primeiras – cana-de-açúcar, milho, arroz e trigo – pertencem à família *Poaceae* (poáceas) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2012). Porém, a aplicação prática da FBN na produção de gramíneas é uma possibilidade recente (HUNGRIA, 2011, p. 21), não atingindo o mesmo nível de adoção quando comparada às fabáceas. Diante do exposto, esta revisão tem o objetivo de buscar o estado da ciência de FBN em *Poaceae*.

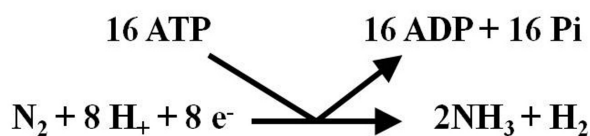
2 BIOQUÍMICA DA FBN

A nitrogenase é composta por dois componentes proteicos, o componente I (FeMo proteína ou dinitrogenase) e componente II (Fe proteína ou dinitrogenase redutase), que trabalham juntos, como uma máquina molecular, catalizando a redução de N₂ (BARNEY et al., 2006, p. 2278). A dinitrogenase redutase atua como redutor para a dinitrogenase, visto que transfere um elétron por vez, hidrolizando ATP; após a transferência se dissocia e é recarregada por redução e substituição do nucleotídeo transferido com ATP. São necessários no mínimo oito eventos de associação/dissociação para cada molécula de N₂ reduzido. A dinitrogenase possui um grupamento metálico denominado cofator FeMo, que é o sítio de ligação e redução do N₂, e que recebe os elétrons da dinitrogenase redutase. Possui ainda outro grupamento denominado *cluster-P*, que mede a transferência de elétrons da dinitrogenase redutase para o cofator FeMo da dinitrogenase (BARNEY et al., 2006, p. 2278; SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009, p. 702).

Há ainda outros tipos de nitrogenase, cuja principal diferença é o metal constituinte do sítio ativo em que o N₂ se liga e é reduzido, o cofator FeMo; no lugar do Mo pode haver Fe ou V. Estas são denominadas nitrogenases alternativas, visto que somente são expressas na falta de Mo. A nitrogenase de V se manifesta preferencialmente à de Fe; a eficiência de redução de N₂ segue nessa mesma ordem. Poucas bactérias diazotróficas apresentam nitrogenases alternativas, porém, todas apresentam a com Mo (BARNEY et al., 2006, p. 2278; REIS et al., 2006, p. 156).

Em suma, a FBN é um processo que transfere 8 elétrons e hidrolisa 16 ATP por molécula de N₂ fixado, caracteriza-se como um dos processos metabólicos com maior gasto energético para a célula. A estequiometria da reação é apresentada na Figura 1 (REIS et al., 2006, p. 156).

Figura 1 – Estequiometria bioquímica da reação de FBN



Fonte: os autores.

3 NICHOS DE COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS NÃO NODULÍFERAS

As bactérias fixadoras de N têm diferentes nichos de colonização associados às plantas, ocupando rizosfera, rizoplano ou ainda, endosfera. Em 1904, Hiltner definiu como rizosfera a região adjacente às raízes que sofre influência direta da sua presença e que tem constituição microbiana diferenciada da massa de solo distante das raízes (HARTMANN; ROTHBALLER; SCHMID, 2008, p. 10). Já o rizoplano se refere à superfície externa do sistema radicular, na qual são formados verdadeiros biofilmes bacterianos (BENZIRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001, p. 558) e à endosfera, ambiente no interior das plantas (ANDRIA; REICHENAUER; SESSITSCH, 2009, p. 3347).

Algumas bactérias podem entrar nas raízes por meio da região entre a epiderme e a coifa ou por espaços que aparecem durante a emergência de raízes secundárias (JAMES et al., 2002, p. 894). De acordo com Hallmann (2001, p. 87), a população bacteriana no interior das raízes é de aproximadamente 10^5 - 10^7 UFC g^{-1} . Entretanto, a sobrevivência na endosfera requer características diferenciadas, como a capacidade de metabolizar os produtos provenientes da fotossíntese, secretar enzimas diversas, mecanismos de desintoxicação e a presença de estruturas locomotoras (flagelos) (RASCHÉ et al., 2009, p. 802; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011, p. 440).

Na região central das raízes encontram-se os vasos do sistema condutor das plantas, entre estes o xilema, responsável pelo transporte de água e nutrientes para a parte aérea, contudo, as bactérias também utilizam passivamente essa via de transporte (COMPANT et al., 2008, p. 89). A capacidade de mobilidade bacteriana, associada ao movimento de água durante o processo de transpiração e ao comportamento do xilema como livre condutor, torna possível que as bactérias cheguem até os órgãos vegetativos e reprodutivos da parte aérea das plantas (JAMES et al., 2002, p. 894; COMPANT et al., 2008, p. 89). A colonização de caules e folhas pelas bactérias endofíticas apresenta populações com densidade de 10^3 - 10^4 UFC g^{-1} (HALLMANN, 2001, p. 87). Já a colonização dos órgãos reprodutivos é ainda mais restrita, com densidade bacteriana na ordem de 10^2 - 10^3 UFC g^{-1} , demonstrando que somente micro-organismos altamente especializados têm competência para colonizar estes nichos (HALLMANN, 2001, p. 87).

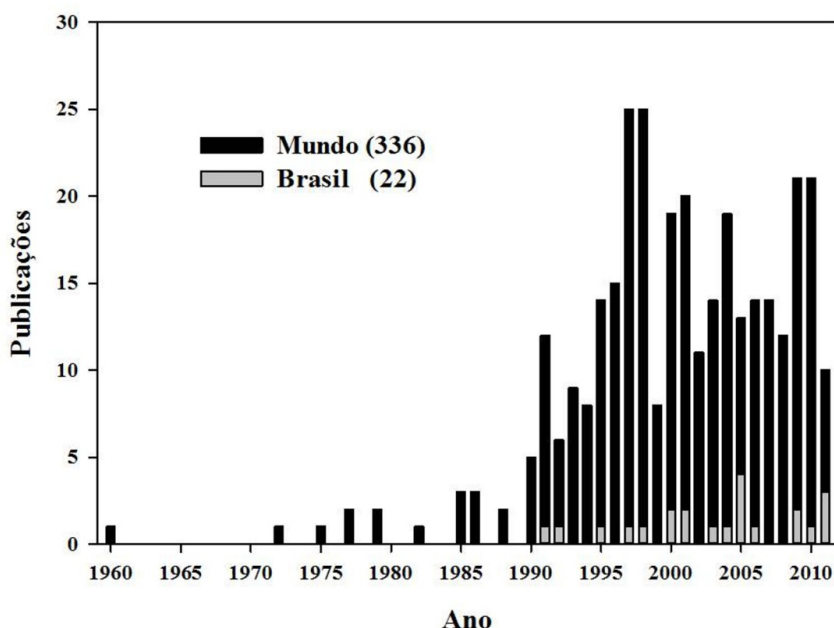
A combinação de técnicas microscópicas com marcadores químico-luminescentes tem facilitado a visualização *in situ* das bactérias diazotróficas endofíticas, demonstrando que o espaço intercelular e os vasos do xilema são os principais nichos de colonização na endosfera (ZAKRIA et al., 2007, p. 201). Essas formas de colonização não proporcionam nenhum tipo de sintoma nas plantas hospedeiras, ao contrário da FBN em fabáceas, em que a colonização radicular endofítica de *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* sp. induz a formação de nódulos macroscópicos (STACEY et al., 2006, p. 114).

Apesar da clara distinção entre os nichos de colonização no *continuum* solo-planta, a classificação das bactérias diazotróficas em relação ao seu *habitat* não é tão simples e exige cautela, considerando que a mesma estirpe bacteriana pode colonizar rizosfera, rizoplano e endosfera. Contudo, esse tipo de classificação tem sido utilizado com base na predominância em determinado local, assim, *Azotobacter* e *Beijerinckia* são consideradas bactérias rizosféricas, *Azospirillum* como endofíticas facultativas e *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* como endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1997, p. 913).

4 ESTADO DA CIÊNCIA

Em pesquisa realizada na base de dados Web of Science[®] utilizando a combinação de palavras-chave “nitrogen fixation” e “grass”, foram encontradas 336 publicações no mundo, sendo 22 relacionadas ao Brasil (Gráfico 1). O número de publicações sobre FBN em gramíneas teve incremento considerável a partir de 1990, atingindo o máximo de 25 publicações no ano de 1997. Contudo, salienta-se que a Web of Science[®] representa somente uma tendência acerca do assunto, considerando que essa base de dados indexa somente periódicos de alto nível. As pesquisas variam entre a avaliação do potencial nativo de FBN e a aplicação no campo na forma de insumos biológicos.

Gráfico 1 – Número de publicações encontradas na base de dados Web of Science[®] utilizando a combinação de palavras-chave “nitrogen fixation” e “grass”



Fonte: os autores.

O potencial de FBN por bactérias diazotróficas nativas em associação com poáceas tem grande amplitude (5 valores superiores a $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), em razão da variação entre as diferentes espécies dessa família; nesse sentido, extrapolações não refletem a realidade. Assim, estimativas regionais e por espécies são mais apropriadas (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008, p. 12). A cana-de-açúcar é uma das espécies nas quais este potencial é maior, como demonstrado por Boddey et al. (2003, p. 145), que em média 37% do N seria proveniente da FBN, em 11 diferentes canaviais (nos Estados de SP, MG, RJ e PE). Os autores comentam que esse efeito pode estar relacionado às bactérias encontradas na cana-de-açúcar – *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp. – terem como nicho de colonização principal a endosfera, demonstrando que os micro-organismos endofíticos seriam mais eficientes em fornecer N para as plantas. Para a cultura do trigo, Reis et al. (2006, p. 153) relatam que a FBN poderia fornecer 12 a 79% da exigência de N na cultura do trigo e 20 a 58% para o arroz. Em outro estudo avaliando bactérias nativas, Morais et al. (2012, p. 34) observaram que o cultivo de determinados genótipos de capim-elefante proporcionam FBN com altos valores de N fixado, entre 36 e 132 kg N ha^{-1} .

Tabela 1 – Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na produção de arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo

Planta	Bactéria diazotrófica	N fertilizante	Produção ¹	Varição ²	Referência
		kg ha ⁻¹	Mg ha ⁻¹	%	
Arroz	Azospirillum seropediacae	50	8,5	- 23	Guimarães et al. (2010)
	Burkholderia sp.	50	11,1	0	
	Sem inoculação	100	11,1		
	Azospirillum sp.	74	8,7	+ 5	Salamone et al. (2010)
	Sem inoculação	74	8,3		
Cana-De-açúcar	Combinação de cinco estirpes	0	152,6	- 3	Schultz et al. (2012)
	Sem inoculação	120	157,2		
	Combinação de cinco estirpes	0	175,0	- 5	Silva et al. (2009)
	Sem inoculação	120	185,0		
	Hesbaspirillum seropediacae	140	153,5	- 0,5	Govindarajan et al. (2006)
	Burkholderia vietnamiensis	140	175,0	+ 13	
	Sem inoculação	280	154,2		
Milho	Azospirillum brasiliense	0	6,6	- 4	Lana et al. (2012)
	Sem inoculação	100	6,9		
	Azospirillum sp.	54	7,3	- 7	Hungria (2011)
	Sem inoculação	104	7,9		
	Azospirillum zeae	55	8,0	- 7	
Azospirillum zeae	110	8,9	+ 3,5	Mehnaz et al. (2010)	
Sem inoculação	110	8,6			
Trigo	Azospirillum sp.	20	2,7	- 7	Hungria (2011)
	Sem inoculação	70	2,9		
	Azospirillum brasiliense	45	4,1	+ 5	Díaz-Zorita e Fernández-Canigia (2009)
	Sem inoculação	45	3,9		
	Achromobacter insolitus	60	3,5	- 8	
Zoogloea ramigera	60	3,8	0	Sala et al. (2007)	
Sem inoculação	120	3,8			

Fonte: os autores.

Nota: Grãos para arroz, milho e trigo e, colmos para cana-de-açúcar. ² Variação percentual dos tratamentos inoculados em relação à ausência de inoculação sob condições contrastantes de N via fertilizante.

Em razão da amplitude da contribuição da FBN por bactérias diazotróficas nativas do *continuum* solo-planta, o isolamento destas bactérias, para posterior aplicação e avaliação de resposta, representa importante fase da pesquisa. Em geral, as bactérias são isoladas e cultivadas *in vitro*, inoculadas nas plantas em ambiente controlado (câmara de crescimento, casa de vegetação, etc.), e, as estirpes mais promissoras, avaliadas em condições de campo (SEVILLA et al., 2001, p. 358; REIS; TEIXEIRA, 2005, p. 151). Quando comprovada a eficiência de determinadas estirpes, estas são utilizadas para a fabricação de insumos biológicos para a agricultura, comumente chamados de inoculantes (CAMPOS; THEISEN; GNATTA, 2000, p. 715; HUNGRIA, 2011, p. 22).

Mesmo após todas as fases supracitadas, o inoculante pode não apresentar o desempenho agrônomo esperado, como demonstrado por Campos, Theisen e Gnatta (1999, p. 401), com o inoculante “Graminante” (a base de *Azospirillum* sp.), que por meio de seis experimentos, com trigo

e aveia, concluíram que o inoculante não apresentava resposta agrônômica. Novamente avaliando o potencial agrônômico de “Graminante”, agora com milho, Campos, Theisen e Gnatta (2000, p. 715) testaram o efeito entre inoculação e épocas de adubação nitrogenada mediante de dois experimentos, em que a inoculação não influenciou nenhum dos atributos avaliados.

Em pesquisas recentes com estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas, têm sido obtidos resultados promissores da inoculação nas culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo (Tabela 1). Conforme Sala et al. (2007, p. 838), Silva et al. (2009, p. 1440), Guimarães et al. (2010, p. 36), Hungria (2011, p. 27), Lana et al. (2012, p. 402) e Schultz et al. (2012, p. 275), a inoculação, quando associada à ausência ou a uma dose reduzida de fertilizante nitrogenado, pode proporcionar produção vegetal semelhante à observada em condições de alta aplicação de N via fertilizante. Por outro lado, Salamone et al. (2010, p. 359), Govindarajan et al. (2006, p. 248), Mehnaz et al. (2010, p. 1854) e Díaz-Zorita e Fernández-Canigia (2009, p. 8) registraram incremento na produção de arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo, quando a inoculação foi associada à alta dose de N via fertilizante. Em adição à FBN, algumas bactérias diazotróficas também produzem hormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) que estimulam a produção vegetal (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008, p. 463). Assim, a associação de efeitos contribui para um melhor aproveitamento dos fertilizantes aplicados e resistência às condições adversas. Os resultados compilados na Tabela 1 também demonstram a disparidade de eficiência em promover a produção vegetal das diferentes estirpes de bactérias.

5 CONCLUSÃO

A aplicação de bactérias diazotróficas em poáceas é uma alternativa potencial para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados, o que tem incentivado as pesquisas nessa área, visando a obter vantagens econômicas e ambientais. Grande avanço tem sido observado nos últimos anos acerca da FBN em poáceas, tanto é que insumos biológicos com essa finalidade estão disponíveis na agricultura brasileira para milho e trigo. Contudo, a pesquisa tem muito trabalho pela frente, tanto para fornecer informações sobre a aplicação das novas tecnologias nas condições das propriedades agrícolas, quanto para estender os benefícios de estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas para outras culturas. Em adição, considerando a diversidade edafoclimática do país e a variação entre cultivares disponíveis, também são importantes estudos que objetivem contemplar a complexidade desses fatores.

REFERÊNCIAS

- ANDRIA, Verania; REICHENAUER, Thomas Gerhard.; SESSITSCH, Angela. Expression of alkane monooxygenase (*alkB*) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 12, p. 3347-3350, 2009.
- BALDANI, José Ivo et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BARNEY, Brett M. et al. Breaking the N₂ triple bond: insights into the nitrogenase mechanism. **Dalton Transactions**, v. 19, n. 19, p. 2277-2284, 2006.

BENIZRI, Emile; BAUDOIN, Ezékiel; GUCKERT, Armand. Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BODDEY, Robert Michael et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139-149, 2003.

CAMPOS, Ben-Hur Costa de; THEISEN, Sergiomar; GNATTA, Valderi. Inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2000.

_____. Inoculante “Graminante” nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 401-407, 1999.

CANFIELD, Donald Eugene; GLAZER, Alexander; FALKOWSKI, Paul. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

COMPANT, Stéphane et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 84-93, 2008.

CRUSIOL, Carlos Alexandre Costa et al. Nitrate role in basic cation leaching under no-till. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 6, p. 1975-1984, 2011.

DA ROS, Clovis Orlando; AITA, Celso; GIACOMINI, Sandro Giacomini. Volatilização de amônia com aplicação de uréia na superfície do solo, no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 799-805, 2005.

DAVIDSON, Eric et al. Excess nitrogen in the U. S. environment: Trends, risks and solutions. **Issues in Ecology**, n. 15, p. 1-16, 2012.

DÍAZ-ZORITA, Martín; FERNÁNDEZ-CANIGIA, María. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 3-11, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: 1 ago. 2012.

GOVINDARAJAN, Munusamy et al. Improved yield micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant Soil**, v. 280, n. 1-2, p. 239-252, 2006.

GUIMARÃES, Salomão Lima et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

HALLMANN, Johannes. Plant interactions with endophytic bacteria. In: JEGER, Mike J.; SPENCE, Nicola J. **Biotic interactions in plant-pathogen associations**. Wallingford: CABI Publishing, 2001.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. Van; ELSAS, J. D. Van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 463-471, 2008.

- HARTMANN, Anton; ROTHBALLER, Michael; SCHMID, Michael. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1-2, p. 7-14, 2008.
- HERRIDGE, David; PEOPLES, Mark; BODDEY, Robert Michael. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.
- HINSINGER, Philippe et al. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 17-152, 2009.
- HOFFMAN, Brian M; DEAN, Dennis R.; SEEFELDT, Lance C. Climbing Nitrogenase: Toward a Mechanism Enzymatic Nitrogen Fixation. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 5, p. 609-619, 2009.
- HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Documentos Embrapa Soja, n. 325).
- JAMES, Euan Kelvin et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropodicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.
- LANA, Maria do Carmo et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.
- LORENZ, Ralph D. Electrical effects on atmospheric chemistry. **Space Science Reviews**, v. 137, n. 1-4, p. 295-299, 2008.
- MALAVOLTA, Eurípedes; MORAES, Milton Ferreira. **Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas**. In: YAMADA, Tsuioshi et al. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.
- MEHNAZ, Samina et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, 2010.
- MORAIS, Rafael F de et al. Contribution of biological nitrogen to Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 23-34, 2012.
- PARAYIL, Govindan. Mapping technological trajectories of the green revolution and gene revolution from modernization to globalization. **Research Policy**, v. 32, n. 6, p. 971-990, 2003.
- RASCHE, Frank et al. DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. **New Phytologist**, v. 181, n. 4, p. 802-807, 2009.
- REINHOLD-HUREK, Barbara; HUREK, Thomas. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- REIS, Veronica Massena et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, Manlio Silvestre. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

- REIS, Veronica Massena; TEIXEIRA, André Kátia Regina dos Santos. Fixação biológica de nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, Adriana Maria de; ASSIS, Renato Linhares de. **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Agrobiologia, 2005.
- SALAMONE, Inés E. et al. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. **Plant Soil**, v. 336, n. 1-2, p. 351-362, 2010.
- SALA, Valéria M. R. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 833-842, 2007.
- SCHULTZ, Nivaldo et al. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 261-268, 2012.
- SEEFELDT, Lance C.; HOFFMAN, Brian M.; DEAN, Dennis R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 701-722, 2009.
- SEVILLA, Myrna et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.
- SILVA, Marinete Flores da et al. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1437-1443, 2009.
- SPIERTZ, Julianne Huub J. Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n. 1, p. 43-55, 2010.
- STACEY, Gary et al. Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 110-121, 2006.
- VITTI, Godofredo Cesar; HEIRINCHS, Reges. Formas tradicionais e alternativas de obtenção e utilização do nitrogênio e do enxofre: uma visão holística. In: YAMADA, Tsuioshi; STIPP; ABDALLA, Silvia Regina; VITTI, Godofredo Cesar. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.
- WHIPPS, John M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.
- ZAKRIA, Muhammad et al. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 *gfp1* and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. **Microbes and Environments**, v. 22, n. 3, p. 197-206, 2007.

Recebido em 30 de maio de 2012

Aceito em 30 de julho de 2012

