

# Flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo

## Population fluctuation of bacteria of the *Azospirillum* sort in soil cultivated with maize and native field

Elaine Pittner<sup>1</sup>  
Osmar Roberto Dalla Santa<sup>2</sup>  
Maurício Osvaldo Moura<sup>3</sup>  
Marta Chagas Monteiro<sup>4</sup>  
Herta Stutz Dalla Santa<sup>5</sup>

### Resumo

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm a capacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN), tornando o nitrogênio disponível para as plantas e também realizam interações com as raízes de plantas, auxiliando no crescimento radicular e conseqüentemente contribuindo para o crescimento e absorção de nutrientes. O objetivo deste trabalho foi de verificar a flutuação populacional das bactérias do gênero *Azospirillum* em amostras de solo na profundidade de 0-5 cm, em área de campo nativo e campo cultivado com milho. O solo da área pesquisada fica sobre um conjunto de relevo denominado Planalto de Guarapuava. O período de coleta foi de agosto de 2003 a abril de 2004. Foram realizadas análises de pH, temperatura e umidade. Não existiu diferença estatística nas contagens de bactérias.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio; solo.

---

1 Especialista, Bióloga; Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste; e-mail: elpittner@yahoo.com.br

2 M.Sc. Graduado em Ciências; Prof. do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste; e-mail: ordallasanta@yahoo.com.br

3 Dr. Biólogo; Prof. do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste; e-mail: moura@unicentro.br

4 Dr<sup>a</sup>. Bióloga; Prof. Do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste; e-mail: martachagas2@yahoo.com.br

5 – Dr<sup>a</sup>. Bióloga; Prof<sup>a</sup> do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste; e-mail: hdalsanta@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 03/02/2006 e aceito em 09/08/2007

## Summary

The bacteria of the *Azospirillum* sort have the capacity to carry through biological nitrogen setting (BNS), becoming available nitrogen for the plants and also they carry through interactions with the roots of plants, assisting in the growth to roots consequently and contributing for the growth and absorption of nutrients. The objective of this work was to verify the population fluctuation of the bacteria of the *Azospirillum* sort in soil samples in the depth of 0-5 cm, area of native field and field cultivated with maize. The soil of the searched area is on a set of called relief Plateaus of Guarapuava. The period of collection was of August of 2003 the April of 2004. Analyses of pH, temperature and humidity had been carried through. Difference did not exist statistics in the countings of bacteria.

Key words: Biological nitrogen setting; soil.

## Introdução

A comunidade microbiana do solo, modulada pelo meio ambiente e disponibilidade de substrato, garante os diversos tipos de relações (competitivas, antagonistas, associativas e simbióticas) entre os componentes dessa comunidade, as quais permitem o controle do crescimento e atividade de cada espécie, evitando explosão populacional e gerando o equilíbrio microbiológico do solo (NOBREGA et al. 2004).

Os microrganismos que fazem fixação biológica de nitrogênio (FBN) têm uma grande importância, visto que esse elemento é componente essencial das proteínas, ácidos nucléicos e outros compostos nitrogenados e, portanto, da vida de todos os seres vivos (DÖBEREINER, 1997; DÖBEREINER e BALOANI, 1998). Nos ecossistemas em clímax, a microbiota se encontra em equilíbrio no solo, mantendo a sua biodiversidade e sustentabilidade, mas esse equilíbrio pode ser facilmente quebrado pelo homem ou por fenômenos

naturais (DÖBEREINER, 1992; HUNGRIA et al. 1997).

Ainda que as maiores contribuições da FBN tenham sido detectadas em oceanos e em plantas leguminosas, algumas plantas da família Gramineae têm mostrado um potencial bastante significativo em obter nitrogênio, pela ação de bactérias fixadoras de nitrogênio (BALDANI et al. 2002).

Existem quatro diferentes aspectos da interação das bactérias do gênero *Azospirillum* com as plantas: i) habitat natural; ii) interação com a raiz da planta; iii) fixação biológica de nitrogênio e iv) produção de substâncias que promovem o crescimento da planta. As bactérias *Azospirillum sp* são geralmente encontradas na rizosfera, sendo que predominantemente coloniza a superfície da raiz (BASHAN e LEVANONY, 1990; BASHAN e HOLGUIN, 1997; MACHADO et al. 1998; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As bactérias *Azospirillum sp* aumentam a massa de raízes, alteram

seu funcionamento e proporcionam mudanças na morfologia destas e dos pêlos radiculares. Promovem o crescimento da planta por induções morfológicas e fisiológicas (a-DALLA SANTA et al. 2004). Os resultados das experiências de inoculação com *Azospirillum* a campo dos últimos vinte anos permitem concluir que estas bactérias são capazes de aumentar o rendimento da agricultura, em diferentes solos, climas e regiões. Estas propriedades podem ser atribuídas ao fato de que *Azospirillum sp* induz a síntese de reguladores de crescimento da planta (RCP) como auxinas, giberilinas, citocininas e etileno, proporcionando o crescimento das raízes. E também a fixação de nitrogênio pode contribuir de maneira significativa não só na agricultura, como também na economia e para o meio ambiente (DÖBEREINER, 1992; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A inoculação de *Azospirillum sp* em sementes de trigo, cevada e aveia, pode aumentar a produtividade, porém estas respostas variam entre as culturas. Aproximadamente 70% dos experimentos conduzidos com inoculação de *Azospirillum sp*, em várias culturas e em diferentes condições climáticas, mostraram aumentos de produtividade em até 30% (DIDONET, 1998; b-DALLA SANTA et al. 2004).

Algumas gramíneas de interesse econômico, tais como o milho, arroz e o trigo, podem estar associados com bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). Outros exemplos importantes seriam a associação de bactérias do gênero *Beijerinckia* com cana-de-açúcar,

*Azotobacter paspali* com a grama batatais (*Paspalum notatum*) e determinados cultivares de trigo com espécies do gênero *Bacillus* (DÖBEREINER et al. 1995).

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas de maior importância no país, não só pela extensão da área cultivada, mas por sua diversidade de utilização, em que se destacam as alimentações animal e humana, e por seus reflexos sócio-econômicos. Assim, estudos para averiguar a ecologia das bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) relacionadas a esta cultura se tornam importantes (DALLA SANTA, 2000; REIS et al. 2000; SHAH et al. 2003).

A distribuição ecológica de *Azospirillum sp* é extremamente ampla e variada. Bactérias desse gênero têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo, por isso, consideradas ubíquas (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

O objetivo deste trabalho foi de verificar a flutuação populacional de bactérias do gênero *Azospirillum* em solo de vegetação nativa (campo) e em solo cultivado com milho.

## Material e Métodos

### Localização da área de coleta

A área de estudo situa-se no município de Guarapuava, estado do Paraná, Brasil, no Terceiro Planalto Paranaense a 1.200m de altitude, na Microregião Homogenea Campos de Guarapuava da região Centro-Sul Paranaense. O clima pela classificação de Köppen, enquadra-se como tipo

Cfb, mesotérmico, úmido e superúmido, sem estação seca e com verões frescos. A temperatura anual é de 17°C, a precipitação média anual é de 1961 mm e a média anual da umidade relativa do ar é de 78% (TOMAZ e VESTENA, 2003). A composição química do solo da área de estudo está apresentada no quadro 1.

As coletas foram realizadas mensalmente em duas áreas (vegetação nativa e campo cultivado). De cada área foram coletadas duas amostras mensalmente onde cada amostra foi composta por três subamostras. Foram escolhidas ao acaso duas áreas de 25 metros quadrados cada uma e os pontos sorteados dentro desta área. As coletas iniciaram-se em agosto de 2003, tanto na vegetação nativa como no campo cultivado, porém o milho foi semeado somente em novembro de 2003 e colhido em março de 2004, para silagem. Assim avaliou-se a população de bactérias *Azospirillum* antes da semeadura, durante o desenvolvimento da cultura (milho) e finalizando as coletas após a colheita do milho.

### Metodologia de amostragem

O solo foi coletado na camada superficial (0-5 cm) por meio de minitrincheiras, de onde as amostras eram retiradas com uma espátula e

acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e homogêneos, levados em seguida para análise no Laboratório/UNICENTRO.

### Contagem de bactérias do gênero *Azospirillum*

Cada amostra de solo (10 gramas) foi diluída em frasco contendo 90 mL de água destilada e esterilizada. A partir desta solução ( $10^{-1}$ ) foram realizadas as diluições seriadas necessárias ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Cada diluição foi inoculada em duplicata em placas contendo de 15 a 20 mL de meio específico para crescimento de *Azospirillum*, com a seguinte composição: Ácido Málico – 5g;  $K_2HPO_4$  – 0,5g;  $MgSO_4 \cdot H_2O$  – 0,2g; NaCl – 0,1g;  $FeCl_3$  – 0,015g; KOH – 4,8g; Extrato de Levedura – 0,5g; Ágar – 15g; Roxo Congo - 15ml (0,1g em 40ml), q. s. p. 1.000 ml de água destilada, pH:7 (FERNÁNDEZ, et al. 1999).

De cada diluição, inoculou-se 0,1 ml na superfície do meio de cultura em placas previamente preparadas e, usando a alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio. As placas foram incubadas invertidas por 48 horas em estufa bacteriológica a 35°. A contagem foi realizada em placas que apresentavam entre 25 a 250 colônias.

**Quadro 1.** Resultados da análise química do solo em amostras na profundidade de 0-5 cm em vegetação do tipo campo nativo e campo cultivado

Amostra	pH CaCl <sub>2</sub>	Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup> Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	T	P	C	pH SMP	V%
		cmolc/dm <sup>3</sup>						mg/ dm <sup>3</sup>	g/ dm <sup>3</sup>		
Nativo	5,2	0,00	4,3	6,47	4,66	0,90	11,67	9,8	41,4	6,2	63,15
Cultivado	5,6	0,00	3,2	8,02	5,55	0,80	12,02	6,2	34,1	6,6	73,38

O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de solo em base seca.

### **Análise físico-químicas**

O pH do solo foi mensurado em equipamento potenciômetro com eletrodo combinado Quimis® segundo EMBRAPA (1997). A temperatura foi medida na profundidade de 0-5 cm, sendo realizada a média dos seguintes horários: 9:00 horas e 15:00 horas (JORGE, 1985). Para umidade pesou-se 20 gramas de solo, retirado de 0-5 cm de profundidade antes e depois de permanecer em estufa durante 24 horas a 100°C (EMBRAPA, 1997).

### **Resultados e Discussão**

Os resultados médios da contagem de *Azospirillum sp* em ufc/g de solo nativo e solo cultivado estão apresentados na figura 1. Os dados obtidos mostram a evolução da população de *Azospirillum sp* nos meses de agosto de 2003 a abril de 2004, em amostra de solo com vegetação dos tipos campo nativo e cultivado com milho.

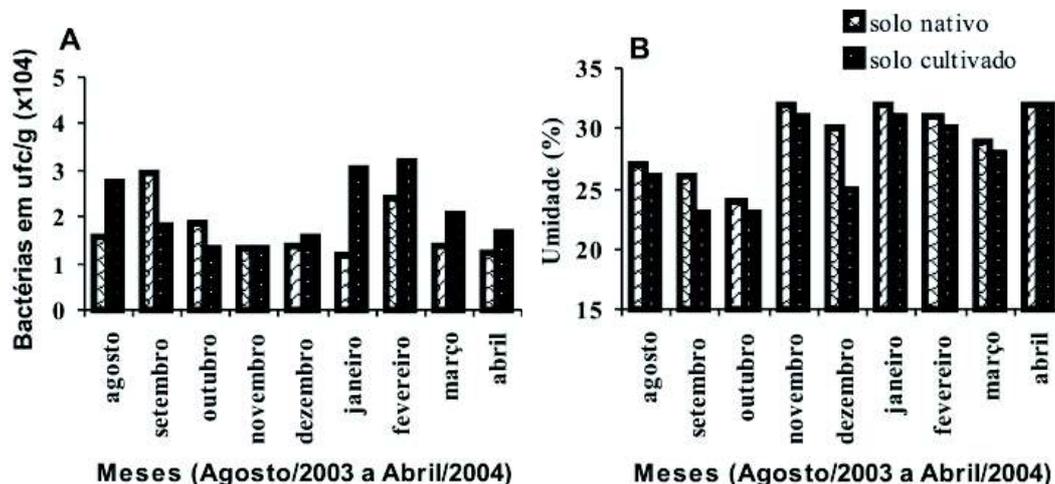
No campo nativo os maiores valores médios de *Azospirillum sp* em ufc/g ocorreram em setembro/2003 e fevereiro/2004, onde os valores de temperatura são superiores a 15°C, pH em torno de 6,5 e umidade acima de 25% (Figuras 1 e 2). No campo cultivado os maiores valores médios de *Azospirillum sp* em ufc/g ocorreram em janeiro e fevereiro de 2004 (Figura 1), juntamente com o valor de temperatura em torno de 25°C, pH próximo de 7,0 e umidade acima de 30% (Figuras 1 e 2). Segundo Catellan e Vidor (1990), a proliferação dos microrganismos é limitada pelo

pH, riqueza mineral do solo, matéria orgânica, temperatura e umidade.

O teor de umidade do solo apresenta pouca influência na sobrevivência de *A. brasilense*, considerada uma espécie cosmopolita, enquanto *A. amazonense*, considerada endofítica, se prolifera mais com o aumento da umidade do solo (OLIVEIRA et al. 2004). Apesar de que em nosso estudo não identificamos as espécies de *Azospirillum*, foi possível verificar um aumento de bactérias quando ocorreu maior umidade (Figura 1). Já BRASIL et al. (2005), avaliando a ocorrência e diversidade de *Azospirillum sp*, observaram que a *A. brasilense*, *A. amazonense* e *A. lipoferum* encontram-se associadas às gramíneas nativas e as populações dessas bactérias foi menor na época de chuva em comparação com a época da seca. É importante ressaltar o fato de *Azospirillum sp* se associar com gramíneas, uma vez que muitas gramíneas são usadas para reabilitação de áreas degradadas e esta associação contribui para a sustentabilidade do ecossistema (NOBREGA et al. 2004). Sendo de grande importância não só avaliar as condições necessárias para o desenvolvimento dessas bactérias, como de suas associações com as gramíneas.

Segundo Ramos et al. (2003) o nitrogênio da biomassa microbiana é maior em profundidade 0-5 cm, apesar de não ter encontrado diferença estatisticamente significativa, enquanto Oliveira et al. (2001) afirma que encontrou maiores índices de carbono da biomassa microbiana em profundidades de 0-5 cm, em solos sob cultivo, independentemente do método utilizado. Kirchhof et al. (1997) avaliando a distribuição das comunidades de *Azospirillum* na camada

**Figura 1.** A) Médias do número de ufc de *Azospirillum sp* por grama de solo e B) Variação da umidade em % em amostras de solo de campo nativo e campo cultivado, na profundidade de 0-5 cm, no período de Agosto/2003 a Abril/2004

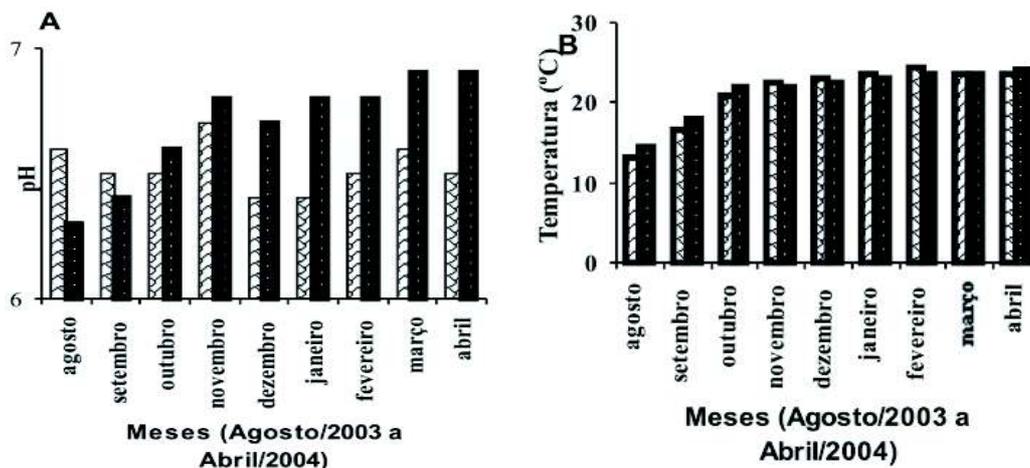


0-10 cm, em solos sob pastagens a 20 anos, observaram o maior número de ufc/g na camada 0-2  $\mu\text{m}$ ,  $6,5 \times 10^6$ .

Catellan e Vidor (1990) mencionam que a interação entre o manejo do solo e da cobertura vegetal com as variações climáticas durante as diferentes épocas do ano, principalmente em regiões subtropicais, onde as estações são bem

definidas, faz com que ocorra uma flutuação sazonal no desenvolvimento microbiano. Essa flutuação é maior nas camadas superiores do solo, onde existem as maiores oscilações na umidade e temperatura. Jain et al. 1987, dizem que em trabalho realizado com *Azospirillum brasilense* mostrou que seu crescimento foi máximo em torno de 30° C.

**Figura 2.** A) Variação do pH e B) Variação da temperatura em °C das amostras de solo de campo nativo e campo cultivado com milho, na profundidade de 0-5 cm, no período de Agosto/2003 a Abril/2004



No campo cultivado as médias de *Azospirillum* em ufc/g de solo, foram maior no período de desenvolvimento da cultura (Figura 3), este aumento pode ser justificado pela elevação da temperatura, fator este, importante para elevar a atividade metabólica e conseqüentemente a multiplicação dos microrganismos, visto também que as médias de pH a partir de novembro ficaram acima de 6,5, favorecendo a multiplicação de bactérias (Figura 2). A presença da cultura do milho também pode contribuir para o aumento da população destes microrganismos, já que alguns gêneros de *Azospirillum* se encontram associados a gramíneas, uma vez que o milho foi semeado em meados de novembro de 2003 e colhido em março de 2004 (Figura 1).

Em análise estatística, ANOVA, averiguou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias de ufc/g de *Azospirillum sp*

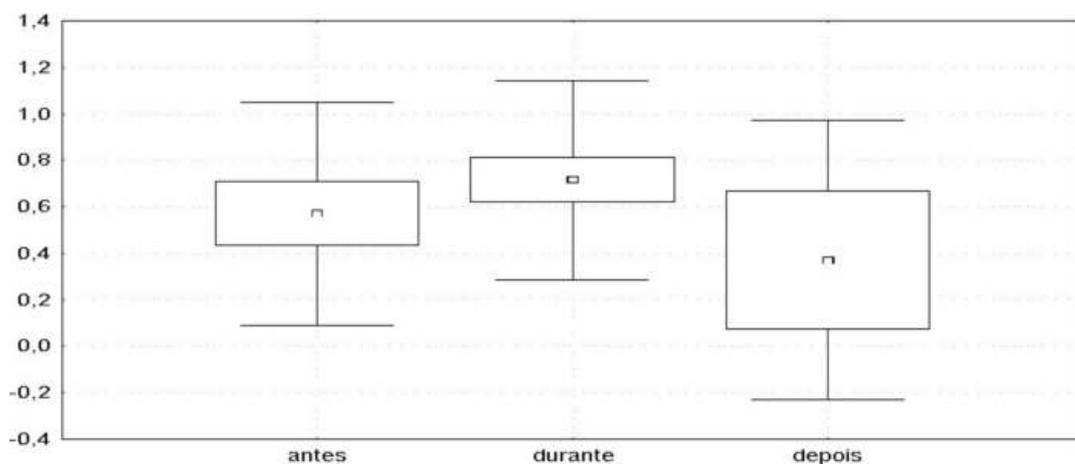
amostrado em profundidade de 0-5 cm em vegetação nativa ( $1,69 \times 10^4$ ) e solo cultivado ( $2,07 \times 10^4$ ), apesar de seus valores médios terem ficado próximos, o valor de  $p$  encontrado, é marginal a  $p=0,05$ .

Os valores médios encontrados antes do plantio do milho, durante o desenvolvimento da cultura e depois da colheita, segundo a ANOVA, não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

### Conclusão

Ocorreu flutuação populacional de ufc/g de *Azospirillum sp* em amostra de solo em profundidade de 0-5 cm em vegetação de campo nativo e em solo cultivado, no período de agosto de 2003 a abril de 2004, e esta pode ter sido influenciada pelas condições ambientais e no campo cultivado, também pela cultura do milho. Quando se comparou a

**Figura 3.** Média, erro da média e desvio padrão do número de *Azospirillum* em ufc/g em profundidade de 0-5 cm em amostra de solo cultivado, antes da semeadura do milho, durante e depois da colheita



média de ufc/g de *Azospirillum sp*, entre a vegetação nativa e campo cultivado, não houve diferença estatisticamente significativa. Bem como, na análise da média de ufc/g de *Azospirillum sp* em amostra de solo cultivado, antes da semeadura do milho, durante o desenvolvimento da cultura e depois da colheita, onde também não ocorreu diferença estatística.

## Referências

- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, V.L.D. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria, cap. potencial biotecnológica de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas*. Caxias do Sul – RS: EDUCS, 433 p. 2002.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 36, p.591-603, 1990.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996), *Can. J. Microbiol.* v.43, p.103 – 121, 1997.
- BRASIL, M. da Silva; BALDANI, J.J.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal sul Matogrossense, *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 29, n.2, 2005.
- CATELLAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 14, p. 133-142, 1990.
- DALLA SANTA, O.R. *Inoculante a Base de Azospirillum Aplicado nas Culturas de Trigo, Cevada, Aveia e Milho*. Curitiba – PR, 2.000, 62 p. dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
- a-DALLA SANTA, O.R.; SOCCOL, C.R.; JUNIOR, P.R.; HERNANDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; DALLA SANTA, H.S.; PANDEY, A. Effects of inoculation on *Azospirillum sp* in maize seeds under conditions. *Food, Agriculture & Environment*, v.2, n.1, 238 p, 2004.
- b-DALLA SANTA, O.R.; HERNANDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; JUNIOR, P.R.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum sp* inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, n.6, 843 p, 2004.
- DIDONET, A.D. *Resultados de Pesquisa sobre Inoculação de Trigo, de Cevada e de Milho com Bactérias do Gênero Azospirillum*, EMBRAPA, n. 4, p. 1-10, fev./1998.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. *Nitrogen – Fixing Bactéria in Nonleguminous Croup Plants*, E. U. A, Springer – Verlag. 120 p, 1987.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. IN: CARDOSO, E. J. B. N. *Microbiologia do Solo*, Campinas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, p. 173-180. 1992.

- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 60 p, 1995.
- DÖBEREINER, J. *A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável*. CNPAB/EMBRAPA, SEROPÉDICA, RJ, v.1, n. 1, 1997.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. Novas tecnologias biocombustíveis. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.1, n. 4, 1998.
- EMBRAPA, *Manual de métodos de análise de solo*, 2º ed. Rio de Janeiro, 212 p, 1997.
- FERNÁNDEZ, R.; DALLA SANTA, O.R.; SOCCO, C.R.; MICHELENA, G. Obtención de um inoculante comercial a partir de *Azospirillum* sp em condiciones brasileiras. *Revista sobre los derivados de la cana de azucar – ICIDICA – vol. 33 n 2*, 1999.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA E.L.; FILHO, A.C. *Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo*, EMBRAPA, n. 56, p. 1-9, abr/1997.
- JAIN, D.K.; BEYER, D.; RENNIE, R.J. Dinitrogen fixation (  $C_2H_2$  reduction ) by bacterial strains at various temperatures, *Plant and Soil* v.103,p. 233 – 237, 1987.
- JORGE, J.A. *Física e manejo dos solos tropicais*, Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 328 p, 1985.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER J.; HARTMANN A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants, *Plant and Soil*, v.194, p. 45 – 55, 1997.
- MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PICHETH, C.F.; ISHIDA, M.L.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; CHUBATSU, L.S.; VITORINO, J.C.; LEGG, L.A.; DELBONI, L.F.; YATES, M.G. e PEDROSA, F.O. I Encontro Paranaense de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Londrina-PR:1998.
- NOBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira do Solo*, v.2, n.28, 2004.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; ADMILSON, E. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Braz. J. Microbiol.*, v.4, n.35, 295p, 2004.
- RAMOS, M.L.G.; PEREZ, K.S.S.; LEIT, B.S.F.; GUIMARÃES, C.M. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo sob sistema de plantio direto e convencional do arroz, no cerrado, XXIX Congresso Brasileiro de Solo, Botucatu - SP, 2003.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. *Critical Reviews in Plant Science*, v.19 n.3, p. 227-247, 2000.

SHAH, Z.; SHAH, S.H.; PEOPLES, M.B.; SCHWENKE, G. D.; HERRIDGE, D. F. Crop residue and fertilizer N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility, *Field Crops Research* 4157, p. 1-11, 2003.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, p.487-506, 2000.

THOMAZ, E.L.; VESTENA, L.R., *Aspectos climáticos de Guarapuava – PR*, Guarapuava: UNICENTRO, 106 p, 2003.