INSTITUTO AGRONÔMICO
PÓS-GRADUAÇÃO

DISSERTAÇÃO

INTERAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. E DE *Bacillus* spp. COM DIFERENTES RIZOSFERAS

LUCIANA FONTES COELHO

Campinas, SP

2006

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

INTERAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. E DE *Bacillus* spp. COM DIFERENTES RIZOSFERAS

LUCIANA FONTES COELHO

Orientadora: Dra. Sueli dos Santos Freitas

Dissertação submetida como requesito partial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, na área de Gestão de Recursos Agroambientais.

Campinas, SP
Março 2006

Aos meus pais faço de minha conquista
o instrumento de gratidão, respeito, amor,
carinho, compreensão e reconhecimento
que recebi e

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho.

- À minha família, em especial a minha mãe, pai e irmão pelo incentivo, respeito, amor, carinho, compreensão e companheirismo.

- À minha orientadora Dra. Sueli dos Santos Freitas pela orientação, paciência, pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

- À pesquisadora Dra. Arlete M. T. Mello pelo auxílio na realização deste trabalho, pela atenção e amizade.

- À pesquisadora Dra Adriana Parada Dias da Silveira, pelos valiosos ensinamentos, incentivo, atenção e companheirismo.

- Ao pesquisador e amigo Alisson Chiorato pela atenção, pelos conselhos e auxílio nas análises multivariadas.

- À Dra. Gláucia M. B. Ambrosano pelo auxílio em parte das análises estatísticas.

- À Dra. Mônica Ferreira de Abreu pelas análises dos solos.

- À Mayra, Vânia, Giuliana e Maria Cristina, minhas grandes amigas, por acreditarem em mim, pelos incentivos e pela força nos momentos difíceis.

- A todos do laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico, em especial à Dona Léo, pela convivência agradável, companheirismo e amizade, às pesquisadoras e amigas Milene, Valéria e Sara e a Rosana e Tereza pelo auxilio no laboratório, aos colegas Mariana, Flávia, Luísa, Núbia e Luiz Guilherme Coelho pela convivência agradável e amizade.

- À pós-graduação do Instituto Agronômico, pela possibilidade de realização deste valioso curso de mestrado e a todos os funcionários dessa instituição.

- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pelo subsídio financeiro, por meio de bolsa de estudo.

- Aos produtores de hortaliças pelas amostras de plantas e pelas trocas de experiências.

- Às colegas de república Fabiana, Rafaela, Ana Karina, Aline e Ana Lúcia por todos os momentos agradáveis e pela amizade.

- A todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando,
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Fazer do medo uma escada,
Fazer do sonho a ponte."

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....viii
RESUMO..... ix
ABSTRACT.....x
1 INTRODUÇÃO.....1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....2
2.1 Taxonomia de *Pseudomonas* e de *Bacillus*.....3
2.2 Mecanismos de Ação de Rizobactérias.....4
2.3 Diversidade de Microrganismos na Rizosfera.....5
2.4 Fatores que Influenciam o Número e a Diversidade de RPCPs na Rizosfera.....8
2.4.1 Espécie de planta.....8
2.4.2 Características do solo.....10
2.4.3 Interação de microrganismos na rizosfera.....13
2.5 Situação Atual.....13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....13
3.1 Amostragem.....13
3.2 Contagem das Bactérias Presentes nas Raízes.....15
3.2.1 Contagem de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*.....15
3.2.2 Contagem de bactérias do gênero *Bacillus*.....15
3.3 Obtenção dos Isolados.....15
3.4 Identificação de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes por Teste Bioquímicos.....16
3.5 Identificação de *Bacillus* spp. por Testes Bioquímicos.....17
3.6 Avaliação da Solubilização de Fosfato, Produção de Ácido Indol Acético e Ácido Cianídrico por *Pseudomonas* spp. Fluorescentes e *Bacillus* spp em Diferentes Rizosferas.....18
3.7 Análises Estatísticas.....20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO…….....21
4.1 Quantificação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na Rizosfera de Diferentes Plantas.....21
4.2 Quantificação de *Bacillus* spp. na Rizosfera de Diferentes Plantas.....22
4.3 Diversidade Fenotípica de Bactérias Fluorescentes do Gênero *Pseudomonas* em Diferentes Rizosferas.....24
4.3.1 Identificação e distribuição dos isolados.....24
4.3.2 Divergência fenotípica por análises de agrupamento.....28

4.3.3 Divergência fenotípica por análise de componentes principais.....31
4.3.4 Descartes dos testes bioquímicos redundantes por componentes principais.....32
4.4 Diversidade Fenotípica de Bactérias do Gênero *Bacillus* spp. na Rizosfera de Diferentes Plantas.....33
4.4.1 Identificação e distribuição dos isolados.....33
4.4.2 Divergência fenotípica por análises de agrupamento.....36
4.4.3 Divergências fenotípicas por análise de componentes principais.....39
4.4.3.1 Descartes dos testes bioquímicos redundantes por componentes principais.....39
4.5 Avaliação da Produção de Ácido Cianídrico, Ácido Indol Acético e Solubilização de Fosfatos por *Pseudomonas* spp. Fluorescentes.....41
4.6 Avaliação da Produção de Ácido Cianídrico, Ácido Indol Acético e Solubilização de Fosfatos por *Bacillus* spp.....45
4.7 Comparação entre os testes estatísticos utilizados.....48
5 CONCLUSÕES.....49
6 REFERÊNCIAS.....50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre os locais de amostragem, espécies e quantidades de plantas amostradas..... 14

Tabela 2 - Características químicas dos solos amostradas..... 14

Tabela 3 - Quantidade de isolados de *Pseudomonas* fluorescentes e de *Bacillus* spp. amostrados de cada rizosfera..... 16

Tabela 4 - Quantidade e origem dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes e de *Bacillus* spp. testados..... 19

Tabela 5 - Número de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* nas rizosferas de alface, rúcula, salsa, chicória e tiririca em quatro locais..... 22

Tabela 6 - Número de *Bacillus* spp. provenientes das rizosferas de diferentes plantas em seis locais..... 23

Tabela 7 - Resultados dos testes bioquímicos para análise da diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescente..... 25

Tabela 8 - Distribuição de isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas* entre quatro espécies de plantas..... 26

Tabela 9 - Distribuição, em número e porcentagem, de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória, com base em testes bioquímicos..... 27

Tabela 10 - Estatísticas descritivas informando os valores máximo, mínimo, médio e os coeficientes de variação fenotípica (CV) obtidos nos 9 descritores bioquímicos avaliados..... 27

Tabela 11 - Agrupamento de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes de acordo com sua similaridade..... 31

Tabela 12 - Estimativa dos coeficientes de ponderação relacionados aos últimos componentes principais de 9 testes bioquímicos avaliados em 50 isolados de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* spp..... 32

Tabela 13 - Testes bioquímicos para identificação de *Bacillus* spp..... 33

Tabela 14 - Características de isolados obtidos em cada espécie vegetal (número e porcentagem em relação ao total)..... 34

Tabela 15 - Valores máximos, mínimos e média e o coeficiente de variação fenotípico (CV), para os 20 descritores bioquímicos avaliados na identificação de *Bacillus* spp..... 35

Tabela 16 - Distribuição, em número e porcentagem, de *Bacillus* spp. isolados da rizosfera de diferentes plantas com base em testes bioquímicos..... 35

Tabela 17 - Origem e classificação taxonômica de isolados de *Bacillus* spp. distribuídos em quatro grupos de acordo com a similaridade entre os isolados..... 37

Tabela 18 - Estimativa dos coeficientes de ponderação relacionados aos últimos componentes principais, referente a 20 testes bioquímicos avaliados em 35 isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp..... 40

Tabela 19 - Produção de HCN e AIA e solubilização de fosfato por *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de diferentes plantas..... 42

Tabela 20 - Distribuição de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtores de AIA, HCN e solubilizadores de fosfato na rizosfera de diferentes plantas e análise dessa distribuição por tabela de contingência e teste de X^2..... 44

Tabela 21 - Produção de HCN e AIA e solubilização de fosfato por *Bacillus* spp. na rizosfera de diferentes plantas..... 46

Tabela 22 - Distribuição de isolados de *Bacillus* spp. produtores de AIA na rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória e análise dessa distribuição por tabela de contingência e teste de X^2..... 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface, rúcula e salsa, amostradas em quatro locais: Matão, Boa Esperança, São Gonçalo e Santa Genebra. Dados analisados em conjunto, transformados em log x. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Média de dez repetições. Coeficiente de variação (CV%) = 9,63.. 21

Figura 2 - Contribuição relativa de cada teste bioquímico para a identificação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes..... 28

Figura 3 - Dendrograma dos dados fenotípicos de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, obtidos da rizosfera de ** alface (A), rúcula (R), salsa (S) e chicória (C). *G1: grupo 1, G2: grupo 2, G3: grupo 3, G4: grupo 4, G5: grupo 5 e G6: grupo 6. (todos os descritores)..... 30

Figura 4 - Análise por componentes principais de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, obtidos da rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória (todos os descritores)..... 31

Figura 5 - Contribuição relativa de cada teste bioquímico para identificação e avaliação da divergência de *Bacillus* spp..... 36

Figura 6 - Dendrograma dos dados fenotípicos de *Bacillus* spp., obtidos da rizosfera de alface ** (A), rúcula (R), salsa (S), chicória (C) e tiririca (T); * G1: grupo 1, G2: grupo 2, G3:grupo 3; G4: grupo 4, G5: grupo 5, G6: grupo 6. (Com descarte dos descritores redundantes)..... 38

Figura 7 - Análise por componentes principais de isolados de *Bacillus* spp. obtidos da rizosfera de alface, rúcula, salsa, chicória e tiririca considerando-se todos os descritores..... 39

Figura 8 - Porcentagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA e HCN e solubilizadoras de fosfato (SolP) na rizosfera de diferentes plantas..... 45

Figura 9 - Porcentagem de *Bacillus* spp. produtores de AIA, HCN e solubilizadores de fosfato (SolP) na rizosfera de alface, salsa, rúcula e chicória..... 47

COELHO, Luciana Fontes. **Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós Graduação – IAC.

RESUMO

A rizosfera favorece a colonização radicular por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), facilitando o estabelecimento da interação de planta e bactéria. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a rizosfera de plantas de alface favorece o desenvolvimento de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas.* Para isso, foram feitas comparações com *Bacillus* spp. e com outras espécies vegetais e análise da diversidade fenotípica dessas bactérias em diferentes rizosferas. Coletaram-se amostras do sistema radicular de alface e de outras plantas em oito propriedades de produtores comerciais, na região de Campinas. Foi feita a contagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. por diluição em série. De maneira geral, observou-se maior quantidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface crespa em relação às outras plantas; isso não ocorreu com *Bacillus* spp., cujos números foram semelhantes entre as várias rizosferas. Durante o processo de contagem foi feito o isolamento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. e os isolados foram submetidos à avaliação da diversidade fenotípica, por meio de testes bioquímicos. Para *Pseudomonas* spp. fluorescentes avaliou-se: produção de gelatinase, fenazina, catalase e dihidrolase da arginina, reação à gema de ovo, crescimento a 41º C e 4ºC, redução de nitrato e capacidade de utilizar citrato, D-trehalose e L-triptofano como fonte de carbono. Os isolados de *Bacillus* spp. foram classificados em aeróbios, anaeróbios ou facultativos e foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: produção de catalase, tirosinase, dihidrolase da arginina e gelatinase, reação à gema de ovo, redução do nitrato, utilização de citrato como única fonte de carbono, crescimento a 3ºC, 45ºC, 50ºC, 60ºC e 75ºC, crescimento em meio com 2%, 5 % e 7% de NaCl, crescimento em meio com estreptomicina, produção de ácido a partir de açúcares: manitol, lactose, arabinose, inositol, frutose e glicose e hidrólise de amido. Utilizou-se análise multivariada para os resultados dos testes bioquímicos e construíram-se dendrogramas para agrupar os isolados de acordo com a similaridade entre eles. A rizosfera de salsa foi a que apresentou menor diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Quanto ao gênero *Bacillus,* a diversidade foi menor na rizosfera de alface e salsa. Avaliou-se também, por meio do teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade, a distribuição de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. produtores de AIA e HCN e solubilizadores de fosfato na rizosfera de diferentes plantas. A porcentagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA e solubilizadoras de fosfato não foi significativamente influenciada pelo tipo de planta. Entretanto, bactérias produtoras de HCN ocorreram em números significativamente menores na rizosfera de citros em comparação com a rizosfera de hortaliças. A rizosfera de hortaliças pode ter liberado alguma substância que favoreceu o desenvolvimento de produtores de HCN.

Palavras-chave: especificidade; RPCPs; diversidade; alface; rúcula; salsa; chicória.

COELHO, Luciana Fontes. **Interaction of** *Pseudomonas* **spp. and** *Bacillus* **spp. with differents rhizospheres**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós Graduação – IAC.

ABSTRACT

Rhizospheres promote the establishment of bacteria and increase root colonization. The aim of this work was to verify if lettuce plants promote root colonization by fluorescent pseudomonads and by *Bacillus* spp. and verify diversity in lettuce rhizosphere by these bacteria. Roots of lettuce and some other plants were sampled in different small properties of commercial producers in Campinas, São Paulo State. Colony forming units (cfu) of fluorescent pseudomonads and *Bacillus* spp. were counted by serial dilution. In the diversity analyses, some isolates were submited to some biochemical tests. The numbers of fluorescent pseudomonads were significantly higher in lettuce than in other plants. *Bacillus* spp. were classified in aerobic, anaerobics or facultative and were submitted to some biochemical tests like: production of arginine dihydrolase, fenazine, gelatinase and catalase, nitrate reduction, egg yolk reaction, use of trehalose, L-triptofano and citrate as carbon sources, growth at 4ºC e 41ºC. The numbers of fluorescent pseudomonads were significantly higher in lettuce than in other plants. *Bacillus* spp. were classified in aerobic, anaerobics or facultative and were submitted to some biochemical tests: production of catalase, tirosinase, arginine dihydrolase and gelatinase, egg yolk reaction, nitrate reduction, use of citrate as carbon source, growth at 3ºC, 45ºC, 50ºC, 60ºC and 75ºC, growth at medium with 2%, 5 % and 7% NaCl, growth at medium with streptomycin, production of acids with manitol, lactose, arabinose, inositol, frutose and glicose and hydrolysis of starch. Multivariate analysis of these caracteristics allowed the clustering of isolates showing high level of similarity. The parsley rizosphere presented minor diversity of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Bacillus* diversity was minor in the rhizosphere of lettuce and parsley. The distribution of HCN and AIA producing and phosphate solubilizing fluorescent *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. were evaluated by X^2 test. The percentage of fluorescent *Pseudomonas* spp. producers of AIA and phosphate solubilizing was not influenced by plant species. However, HCN producing bacteria occurred in significantly lower numbers in citrus rhizosphere in comparison with vegetable rhizosphere. It is possible that vegetable rhizosphere may have produced some substance that favored the development of HCN producers.

Key words: specificity; PGPR, diversity, lettuce, parsley, rucula, chicory.

1 INTRODUÇÃO

A produção de inoculantes de baixo custo com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) é uma alternativa para diminuir a utilização de agrotóxicos e produtos químicos, que, se forem utilizados de forma errônea, podem atingir o lençol freático e contaminar os recursos hídricos. Além disso, o uso de tais inoculantes pode aumentar a produção agrícola, tornar o produto mais competitivo e diferenciado e ainda diminuir os custos para o produtor, pela menor necessidade de insumos.

As rizobactérias são microrganismos que habitam a rizosfera, ou seja, a região que recebe influência das raízes. Essas bactérias podem ser benéficas, como, por exemplo, as RPCPs, patogênicas ou neutras para as plantas. Dentre as principais RPCPs destacam-se: *Pseudomonas* spp. fluorescentes*, Bacillus* spp., *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp.

A alface foi estudada neste trabalho como cultura principal, pois, além de ser a hortaliça folhosa mais consumida entre os brasileiros, é sensível às condições adversas de temperatura, umidade e chuva, exigindo uma especial atenção quanto ao controle de pragas e doenças.

As RPCPs podem aumentar o crescimento de plantas por promoverem a mineralização de nutrientes, pela solubilização de fosfatos minerais, pela produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberelina. Além disso, RPCPs são importantes agentes de controle biológico, pois podem suprimir microrganismos patogênicos da rizosfera, pela produção de β-1,3-glucanase, quitinases, antibióticos, ácido cianídrico e sideróforos, que são compostos de baixo peso molecular, quelantes de ferro, produzidos pela maioria das bactérias sob condições limitantes desse elemento. Podem ainda atuar como biorremediadores de áreas contaminadas, por degradarem substâncias xenobióticas.

Embora haja inúmeros relatos positivos sobre a atuação das RPCPs, como os já citados acima, a utilização desses microrganismos nem sempre tem fornecido bons resultados, pois existe a dificuldade dos isolados introduzidos em se estabelecer e

sobreviver em condições de campo. Portanto, é necessário, primeiramente, estudar a ecologia desses microrganismos na rizosfera, além de obter informações quanto aos mecanismos de colonização de raízes, especificidade de hospedeiros, influência de fatores ambientais e interações com outros microrganismos.

Pela avaliação do número e da diversidade de bactérias na rizosfera de plantas, em diferentes tipos de solo, é possível conhecer alguns dos fatores que exercem influência no estabelecimento de microrganismos em um ambiente e avaliar a habilidade de uma determinada espécie de microrganismo em se estabelecer na rizosfera.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a rizosfera de plantas de alface favorece o desenvolvimento de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas.* Para isso, foram feitas comparações com *Bacillus* spp. e com outras espécies vegetais e análise da diversidade fenotípica dessas bactérias nas diferentes rizosferas avaliadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As pesquisas com rizobactérias começaram na Rússia e na Ucrânia, em 1885, usando *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies de *Bacillus* (ZAGO, 2003).

De acordo com FREITAS (1994), as pesquisas com fertilizantes bacterianos intensificaram-se após os trabalhos feitos por BURR et al. (1978), ao demonstrarem aumentos significativos na produção de batatas que receberam inóculo de *Pseudomonas fluorescens* e de *P. putida*, e após os trabalhos de KLOEPPER & SCHROTH (1978), que adotaram pela primeira vez a expressão "rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)" para denominar as bactérias benéficas que vivem na rizosfera de plantas sem estabelecer relações simbióticas. Existem relatos da promoção de crescimento por rizobactérias em várias culturas como trigo (LUZ, 2001), plantas ornamentais (YUEN & SCHROTH, 1986), alface (FREITAS et al., 2003), soja (CATTELAN et al., 1999), citros (FREITAS & VILDOSO, 2004) e árvores florestais (GARCIA et al., 2004), entre outras.

Embora haja vários relatos positivos na literatura quanto à utilização de RPCPs na agricultura, foram encontrados alguns casos de inconsistência desses resultados. Por exemplo: o isolado Ps 91, do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, foi utilizado em experimentos com plantas de alface (FREITAS et al., 2003). No experimento em

areia esterilizada, mostrou-se patogênico, matando todas as plantas. Entretanto, em um outro experimento em solo com adição de esterco, o mesmo isolado comportou-se como promotor de crescimento (SOTTERO, 2003).

Essa inconsistência é a principal limitação para o emprego comercial dessas bactérias. Um fator que poderia explicar esses resultados seria a baixa colonização das raízes pelas bactérias, talvez pela liberação diferenciada de exsudatos radiculares, que varia com a espécie da planta, com os fatores ambientais ou até mesmo pela competição com algum outro microrganismo.

2.1 Taxonomia de *Pseudomonas* e de *Bacillus*

Pseudomonas spp. fluorescentes são bactérias Gram-negativas e produzem um pigmento verde-amarelado fluorescente em meio B de KING et al. (1954), observado sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta. De acordo com STANIER (1969), esses organismos podem ser encontrados na água e no solo. As espécies mais importantes desse grupo são *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, geralmente estudadas com o objetivo de avaliar a promoção de crescimento em plantas, e *Pseudomonas aeruginosa*, considerada patogênica a animais.

A diversidade metabólica de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* dá a essas bactérias uma grande habilidade para adaptação a vários ambientes, tais como solo e rizosfera.

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas e podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. São resistentes ao calor e a outros agentes destrutivos (STANIER, 1969). Podem oxidar uma ampla faixa de compostos orgânicos e em alguns casos são fermentativas. A maioria delas tem exigências nutricionais simples, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas B como fatores de crescimento (STANIER, 1969). Formam endósporos – característica que as coloca entre os esporulados – e apresentam a habilidade de produzir antibiótico (FREITAS & PIZZINATTO, 1997). A formação de endósporos aumenta a resistência aos fatores adversos. Dessa forma, podem ser armazenados, como inoculantes, por um período

mais longo, e possuem maior tempo de permanência no solo, além da facilidade de aplicação.

2.2 Mecanismos de Ação de Rizobactérias

Os efeitos benéficos exercidos pelas RPCPs podem ser diretos ou indiretos. A promoção direta de crescimento ocorre quando uma rizobactéria produz metabólitos que promovam diretamente o crescimento das plantas sem a interação com a microbiota do solo, como, por exemplo, pela produção de reguladores de crescimento, tais como auxinas (ASGHAR et al., 2002), citocinina (ARKHIPOVA et al., 2005), giberelina (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001; JOO et. al., 2004) e pela solubilização de fosfatos minerais (FREITAS et al., 1997). Já a promoção de crescimento indireta ocorre pela eliminação de patógenos, ou seja, pela produção de β-1,3-glucanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN & ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). A produção de HCN também pode promover o crescimento das plantas diretamente, pelo aumento do desenvolvimento dos pêlos radiculares (LUZ, 1996). RPCPs podem, ainda, ativar mecanismos de defesa das plantas e induzir resistência sistêmica a vários patógenos, como observado por TEIXEIRA et al. (2005) ao avaliarem um efeito significativo da aplicação de rizobactérias no controle da ferrugem do eucalipto.

Sideróforos são compostos de baixo peso molecular, quelantes do ferro, produzidos em locais de baixa concentração desse elemento. Embora o ferro seja abundante em solos aerados, apresenta baixa solubilidade; dessa forma, a disponibilidade do ferro para as raízes das plantas pode depender de quelantes orgânicos. Na medida em que o pH do solo diminui, a disponibilidade de ferro aumenta e os sideróforos tornam-se menos efetivos. Com a produção de sideróforos, os microrganismos imobilizam Fe^{3+}, tornando-o menos disponível a outros que não produzam essa substância. Assim a comunidade de microrganismos indesejáveis é reduzida.

É interessante ressaltar que algumas rizobactérias podem ser consideradas deletérias (RD) e inibir o crescimento de plantas. O mecanismo que poderia estar envolvido nesse processo seria a produção de HCN. Essas rizobactérias têm sido

estudadas como importantes agentes no controle de plantas daninhas (KREMER & SOUISSI, 2001).

Além da utilização de rizobactérias na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de doenças e de plantas daninhas, muitas espécies do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. podem ser utilizadas na conservação do meio ambiente e na biorremediação de solos contaminados pois possuem a habilidade de degradar compostos xenobióticos (BUNDY et al., 2004; NEUMANN et al., 2004).

Recentemente foi descoberto que as bactérias se comunicam entre si, por meio de sinais moleculares. SHARMA et al. (2003) afirmaram que esses sinais são auto-induzidos, pelo acúmulo extracelular de alguma substância, como acil homoserina lactona para bactérias Gram-negativas e hepta ou octapeptídeos para bactérias Gram-positivas, que, ao atingir uma concentração crítica, desencadeará uma resposta que comandará a expressão do gene, ocorrendo alterações fenotípicas, como, por exemplo, a produção de antibióticos. Essa forma de comunicação foi denominada de "quorum sensing (QS)" ou sensoriamento populacional.

2.3 Diversidade de Microrganismos na Rizosfera

Os dois fatores que mais afetam a diversidade de microrganismos na rizosfera são a espécie de planta e o tipo de solo. Em algumas situações observou-se que o solo (LATOUR et al., 1996) foi o fator determinante da diversidade e em outras foi a planta (LEMANCEAU et al., 1995). A comunidade de bactérias pode variar de acordo com o habitat em que se encontra: os gêneros de bactérias são diferentes na rizosfera, solo e rizoplano (interface do solo com a epiderme da raiz). Em um estudo feito por MAHAFFEE & KLOEPPER (1997), ocorreu maior diversidade de microrganismos na rizosfera de pepino do que no solo não rizosférico; *Bacillus* e *Arthrobacter* spp. foram dominantes no solo, enquanto bactérias Gram-negativas foram mais abundantes na rizosfera e rizoplano. No rizoplano observou-se menor diversidade de bactérias do que na rizosfera. *Bacillus* e *Pseudomonas* foram os gêneros dominantes na rizosfera.

Algumas gramíneas são plantas perenes, tipo C3, portanto apresentam crescimento mais lento, motivo pelo qual liberam menos carbono na rizosfera. Por isso, a diversidade de microrganismos em plantas perenes geralmente é menor do que em planta anuais (GRAYSTON et al., 1998).

A colonização da rizosfera irá depender da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares; dessa forma, a variedade de compostos orgânicos liberados pela planta é considerada por muitos autores como o principal fator responsável pela diversidade de microrganismos na rizosfera. Em um estudo feito com isolados fluorescentes de *Pseudomonas* spp., mutantes com incapacidade de crescer em meio com ácidos orgânicos colonizaram raízes de tomate em menor escala; o mesmo comportamento foi observado para mutantes com baixa capacidade de crescer em meio com açúcar (KRAVCHENKO et al., 2003).

LEMANCEAU et al. (1995) verificaram que a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes da rizosfera de tomate foi menor do que na rizosfera de linho e que os substratos rizosféricos mais seletivos foram os ácidos orgânicos e aminoácidos. Ao estudar a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de hortaliças, ZAGO (2003) observou que a cultura da alface foi a que apresentou maior índice de diversidade. As avaliações fenotípicas e genotípicas revelaram elevada diversidade entre as várias populações de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* associadas às culturas de alface, cenoura e pepino sob cultivo orgânico.

Entre as rizobactérias, as Gram-negativas são mais favorecidas do que as Gram-positivas e as formas não esporuladas mais do que as esporuladas. Três gêneros são predominantes: *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Agrobaterium,* sendo que essa predominância poderia ser explicada pela maior taxa de multiplicação ou menor tempo de geração. Foi verificado que, para *Pseudomonas*, na rizosfera este valor era de 5,2 horas, enquanto que, para *Bacillus*, era de 39 horas. As mesmas bactérias, no solo, apresentam tempos de geração de 77 e 100 horas respectivamente (CARDOSO & FREITAS, 1992).

O favorecimento de uma determinada espécie fluorescente de *Pseudomonas* spp. depende das características do solo e da espécie de planta. CLAYS-JOSSERAND et al. (1995) observaram que o número de *P. fluorescens* foi maior na região da rizosfera de tomate do que em solos sem cultivo e que o contrário aconteceu com *P. putida.* A rizosfera de tomate pode ter liberado alguma substância que favoreceu o desenvolvimento de *P. fluorescens* em relação a *P. putida*.

A metodologia utilizada para estudos sobre diversidade de RPCPs na rizosfera de plantas pode ser baseada em testes bioquímicos, “kits” comerciais e métodos moleculares. Alguns autores utilizam somente “kits” comerciais (GRAYSTON et al., 1998), ou os três métodos citados acima em conjunto (LEMANCEAU et al. 1995;

LATOUR et al. 1996; RANGARAJAN et al. 2001; ZAGO, 2003). Já SICILIANO et al. (2003) utilizaram DGGE e hibridização de DNA para avaliar a diversidade de bactérias na rizosfera de *Festuca arundinacea*.

Os métodos bioquímicos são baratos e podem fornecer informações da comunidade heterotrófica, da atividade dos microrganismos e da diversidade funcional. Uma das limitações desses testes é o fato de selecionar somente microrganismos que cresçam em meio de cultura nas condições experimentais definidas, como para temperatura e pH. Além disso, tornam difícil o cultivo de um alto número de bactérias e não consideram o potencial de inibição entre colônias. Adicionalmente, crescimento em meio de cultura favorece aqueles microrganismos com altas taxas de crescimento (GARLAND, 1996) e permite apenas uma estimativa da diversidade metabólica "in situ" ou seja, uma espécie não ativa ou representativa de somente uma minoria da fração da comunidade "in situ" pode ser superestimada. Além disso, a fonte de carbono não é necessariamente representativa daquela contida no solo (YAO et al., 2000 citados por KIRK, 2004).

Técnicas moleculares tais como composição das bases do DNA, hibridização e as diferentes técnicas de PCR são preferidas por alguns autores em análises de diversidade por serem confiáveis, reproduzíveis, de rápida execução e permitirem a identificação de microrganismos que não crescem em meio de cultura. Algumas técnicas, como o DGGE/TGGE, permitem que muitas amostras sejam analisadas ao mesmo tempo; outras, como o método da hibridização, permitem avaliar a diversidade "in situ" (KIRK, 2004).

Entretanto, a maioria das técnicas moleculares não fornece uma indicação da diversidade funcional da comunidade microbiana, muito importante em estudos de diversidade de RPCPs, sendo portanto necessária a utilização dessas técnicas juntamente com os métodos bioquímicos ou a utilização da técnica do DNA "microarrays", que fornece informações sobre a diversidade funcional (GREENE & VOORDOUW, 2003 citados por KIRK, 2004). Além disso, se o método de extração do DNA da célula usado for muito suave, somente as células das bactérias Gram-negativas seriam lisadas e não as Gram-positivas. Se o método for muito severo, ambas, tanto células Gram-negativas como Gram-positivas, podem ser lisadas, mas seu DNA pode se dividir (WINTZINGERODE et al., 1997 citados por KIRK, 2004).

A escolha do melhor método para avaliar a diversidade de bactérias deve ser feita de acordo com a natureza da investigação, o conhecimento profissional, a habilidade do pesquisador ou da equipe técnica e a disponibilidade do laboratório (YAMAOKA-YANO & VALARINI, 1998).

Para a análise estatística dos dados de diversidade utiliza-se, com freqüência, a análise multivariada (LATOUR et al., 1996; CATTELAN, 1998; GRAYSTON et al., 1998; ZAGO, 2003 e SALLES, 2004). Um dos métodos de análise multivariada freqüentemente utilizado para examinar dados de diversidade é a Análise por Componente Principal (ACP), que apresenta em forma gráfica o máximo de informação contida em uma matriz de dados com o objetivo de visualizar a proximidade entre acessos e os vínculos entre as variáveis (CHIORATO, 2004).

2.4 Fatores que Influenciam o Número e a Diversidade de RPCPs na Rizosfera

O crescimento microbiano na rizosfera é estimulado por uma contínua deposição de substratos orgânicos prontamente assimiláveis liberados pelas raízes. Dentre eles destacam-se os exsudatos, ou seja, os açúcares, aminoácidos, hormônios e vitaminas, que são liberados das raízes sem envolvimento de energia metabólica, os lisados, que são resultantes da autólise das células, as mucilagens e secreções, que são carboidratos e enzimas, que dependem de processos metabólicos para serem liberados; ainda existem as células mortas e o CO_2. O fluxo de substrato pelas raízes é um resultado da fotossíntese (LYNCH & WHIPPS, 1990) e varia principalmente de acordo com o tipo de planta e com as características do solo.

2.4.1 Espécie de planta

Com relação à influência da espécie da planta em microrganismos da rizosfera, foi observado por FREITAS & VILDOSO (2004) um favorecimento de bactérias fluorescentes e não fluorescentes na rizosfera de tangerina ‘Cleópatra’ em relação a limão cravo, ambos em condições de citropote.

Uma das melhores forma de se avaliar o efeito da espécie de planta na comunidade de microrganismos da rizosfera seria pela determinação de especificidade, a maioria dos métodos microbiológicos encontrados na literatura para se determinar especificidade em RPCPs são indiretos e estão relacionados com o isolamento de bactérias e posterior inoculação na mesma espécie de planta ou em espécies diferentes, como relatado por GARCÍA et al. (2003) ao observarem que o isolado de *Pseudomonas fluorescens* obtido de *Lupinus albus* colonizou a rizosfera de plantas de pimenta e nela se desenvolveu.

A análise da diversidade fenotípica e genotípica na rizosfera também é uma forma de conhecer o efeito da planta sobre a comunidade microbiana do solo, como demonstrado por LEMANCEAU et al. (1995) e LATOUR et al. (1996), por meio de análise da distribuição de isolados de *Pseudomonas fluorescens* em plantas de linho e de tomate. Outra forma indireta de se avaliar a especificidade seria pela habilidade do isolado em promover o crescimento de planta, como verificado por GOMES et al. (2003): utilizando *Bacillus pumilus* e *Bacillus thuringiensis* obtidos da rizosfera de couve observaram que os isolados promoveram crescimento significativo em plantas de alface, evidenciando que não houve especificidade para o hospedeiro. Nesse caso, as bactérias facilmente podem colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade, e promover-lhes o crescimento. Isolados de *Bacillus* provenientes de couve, feijão e rabanete promoveram crescimento em mudas micropropagadas de abacaxi, demonstrando falta de especificidade quanto à promoção do crescimento (MELO et al., 2002).

Especificidade também pode ser avaliada pela taxa de colonização da bactéria na rizosfera de uma determinada planta. Uma extensiva colonização é essencial para o estabelecimento e o desenvolvimento das comunidades microbianas associadas às raízes. As características geralmente importantes para tornar uma colonização eficiente são: mobilidade (SAKAI et al., 1996), rápida taxa de crescimento (CATTELAN, 1998) e aderência radicular (ANDERSON, 1983). Isolados de *Pseudomonas* da rizosfera de milho foram inoculados em milho e tomate e observou-se melhor colonização na rizosfera da primeira espécie vegetal por BENIZRI et al. (1997), que observaram que o isolado obtido de milho foi capaz de utilizar melhor os componentes radiculares. Pode se afirmar que o isolado de milho, por ter sido inoculado na mesma espécie de onde se originou, apresenta características que o tornam mais adaptado à planta de milho do que o isolado obtido da rizosfera de tomate.

Para alguns autores a aglutinina poderia ser uma importante ferramenta para determinação de especificidade. Aglutininas são complexos de carboidrato e proteínas que se localizam na superfície das raízes, são estáveis ao calor, de alto peso molecular e requerem Mg^{2+} para sua atividade (ANDERSON, 1983); podem facilitar a fixação de bactérias na superfície das raízes. Todavia, células de *P. putida* da rizosfera de feijão foram aglutinadas em maior extensão do que *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (ANDERSON, 1983).

Entretanto, a aglutinina nem sempre está relacionada com a taxa de colonização e especificidade. GLANDORF et al. (1994) observaram que a colonização de raízes de batata por *Pseudomonas* foi independente da aglutinação. Nenhuma diferença na colonização de raízes de batata foi observada entre os isolados de *P. putida* e mutantes dessa bactéria negativos para aglutinação (Agg^-). A aglutinina estudada pode estar envolvida na aderência às raízes, em curto prazo, de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

GLANDORF et al. (1993) compararam os isolados de *Pseudomonas* spp. da rizosfera de batata, trigo e grama quanto a seus lipopolissacarídeos (LPS) e proteína do envelope celular (PEC). A maioria dos LPSs e PECs observados em cada cultura não foram detectados nas outras culturas, sugerindo especificidade. No mesmo trabalho, os autores não observaram especificidade quando os isolados foram inoculados nas plantas com o objetivo de se observar a colonização por meio da avaliação da aglutinina; nesse caso, os isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de grama, trigo e batata não foram preferencialmente aderidos pelas aglutininas das raízes dos seus hospedeiros, mostrando a ausência de especificidade. As diferenças significativas observadas não foram correlacionadas com a origem dos isolados (GLANDORF et al., 1993).

O número de células do isolado F113 de *P. fluorescens* na rizosfera de alfafa foi semelhante ao encontrado nas rizosferas de tomate e ervilha e, principalmente, em beterraba açucareira, espécie a partir da qual a bactéria foi inicialmente isolada. Isso indica que a bactéria pode colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, não existindo, dessa forma, especificidade para um único hospedeiro (VILLACIEROS et al., 2003).

2.4.2 Características do solo

Em um estudo sobre colonização de bactérias do gênero *Pseudomonas* em raízes de alface, SOTTERO (2003) observou que o número dessas bactérias não foi influenciado pelas condições de cultivo, contrastando com CHIARINI et al. (1998), que

afirmaram que o solo teve influência marcante na comunidade microbiana da rizosfera de milho.

Quanto à textura pode-se dizer que a taxa de adesão dos microrganismos às partículas minerais do solo depende do microrganismo e da granulometria das partículas. As bactérias Gram-positivas são mais facilmente adsorvidas ao solo do que as Gram-negativas e, com relação à granulometria das partículas, a montmorilonita é mais eficiente que a caulinita (TSAI et al., 1992).

Solos com textura argilo-arenosa e fertilidade superior são melhores para o desenvolvimento de RPCPs do que solos arenosos de menor fertilidade, pelo menos na rizosfera de trigo em condições de casa de vegetação (FREITAS & GERMIDA, 1990). Solos mais arenosos facilitam a lixiviação de nutrientes, tornando-os não disponíveis aos microrganismos (TSAI et al., 1992).

Com relação ao nitrogênio, verificou-se que esse elemento pode diminuir a colonização da rizosfera por *Pseudomonas* spp. fluorescentes quando se encontra em altas concentrações (LILJEROTH et al., 1990) ou em situações de deficiência (MARSCHNER et al., 1999). É importante salientar que o teor de fertilizante, além de afetar a quantidade de bactérias na rizosfera, também pode influenciar no tipo de espécie que irá predominar como observado por ZAGO (2003) ao estudar o efeito da quantidade de N proveniente de esterco em espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Verificou que na dose de 100 kg $N.ha^{-1}$ houve uma predominância de isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa;* já nas doses de 200 e 400 kg $N.ha^{-1}$ predominou *P. putida*.

Dependendo da fonte de N do fertilizante, se NO_3^- ou NH_4^+, o número de bactérias pode aumentar ou diminuir. Esses efeitos são provavelmente devidos a mudanças na exsudação radicular, que será menor quando a fonte de N é o NH_4^+ porque, nesse caso, as plantas absorvem mais cátions do que ânions do solo, resultando em maior excreção de H^+ e em valores mais baixos de pH na rizosfera. Em condições de alta concentração de H^+ na rizosfera ou no apoplasto, ocorre a retenção de exsudatos, que prejudica a colonização. Além disso, diminuindo o pH da rizosfera a colonização da raiz poderia ser influenciada negativamente por bactérias que tipicamente preferem ambientes neutros e alcalinos (MARSCHNER et al., 1999).

Em outro experimento, a aplicação de calcário no cultivo de cenoura aumentou significativamente o número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em comparação com solo sem calcário (EL-TARABILY et al., 1996), demonstrando mais uma vez o efeito

positivo do aumento do pH na rizosfera sobre o crescimento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

O conteúdo de água do solo pode favorecer a colonização das raízes pelas bactérias, pois melhora seu movimento até o sistema radicular. Pode ainda, influenciar o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos significativamente. O'CALLAGHAN et al. (2001) observaram que a umidade do solo interferiu significativamente na sobrevivência de *P. fluorescen*s: o número desses microrganismos diminuiu mais rapidamente em solos secos do que em solos úmidos, independentemente da temperatura. Em condições de casa de vegetação os fatores ambientais são mais controlados e favoráveis ao crescimento bacteriano, o que não ocorre em condições de campo, onde o déficit hídrico é mais provável (YUEN et al., 1986).

A aeração do solo também é um fator importante; portanto, práticas culturais que ajudem a aumentar a taxa de troca de gases poderão aumentar a eficiência das bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* (ZAGO, 2003). A taxa de troca de gases no solo pode ser aumentada por apropriadas estratégias de manejo, que ajudem a reduzir o excesso de umidade e a compactação do solo.

O número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi maior em solos onde havia minhocas do que onde não havia; isso ocorreu devido ao aumento na aeração do solo. O número de *P. putida* foi maior em raízes localizadas em solos com maior teor de O_2 (TAVARIA & ZUBERER, 1998).

Com relação à temperatura ideal para crescimento *in vitro* de *P. fluorescens* e *P. putida* seria de 25-30ºC. Entretanto, no solo, as temperaturas mais adequadas são de 12 a 18ºC (MELO, 1998).

Dessa forma, altas temperaturas podem prejudicar o desenvolvimento de algumas bactérias. GAMLIEL & KATAN (1993) observaram que a solarização do solo, reduziu significantemente o número de *Pseudomonas fluorescens;* entretanto, após o plantio de tomateiros em solos solarizados a bactéria rapidamente colonizou a rizosfera e as raízes das plantas, devido ao menor número de competidores. Todavia, em um estudo feito por GAMLIEL & STAPLETON (1993), a comunidade de *Bacillus* spp. não foi reduzida pela solarização do solo e foi semelhante nas raízes de alface em solo previamente solarizado e não solarizado. Esses estudos demonstraram que *Bacillus* spp., pelo fato de serem bactérias Gram positivas e produzirem endosporos, possuem uma resistência maior às adversidades do meio ambiente, como alta temperatura, do que bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

O tipo de herbicida pode reduzir, aumentar ou não afetar o crescimento e a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. BOLDT & JACOBSEN (1998) testaram a toxicidade dos herbicidas metilsulfuron, clorosulfuron e tifensulfuron em *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Dentre esses, o metilsulfuron foi considerado o mais tóxico. A redução no crescimento dessas bactérias pode ser explicada pela inibição da enzima acetolactato sintase, responsável pela síntese de valina, leucina e isoleucina que neutralizam o efeito tóxico do herbicida.

Entretanto, MEHARG et al. (1998) observaram que o herbicida 1,2-diclorobenzeno, não afetou significativamente o número de microrganismos. A diversidade fenotípica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes não foi afetada.

2.4.3 Interação de microrganismos na rizosfera

Na rizosfera os microrganismos podem interagir de maneira positiva, negativa ou neutra. BENIZRI et al (1997) observaram que a co-inoculação, em plantas de milho, de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes obtidos nas rizosferas de milho e de tomate é melhor do que a inoculação de um único isolado, sendo que a comunidade final de isolados de milho aumentou 10 vezes na rizosfera e 100 vezes no rizoplano e no córtex da raiz comparada com a inoculação isolada. Acredita-se que os isolados, quando inoculados em conjunto, podem estimular de maneira mais significativa a liberação de algum exsudato radicular benéfico ou que tenham produzido algum metabólito que favoreceu a colonização da rizosfera.

A densidade populacional de *Pseudomonas fluorescens* na rizosfera é usualmente reduzida pela colonização de fungos micorrízicos arbusculares (VÁZQUEZ et al. 2000). Entretanto, SILVEIRA et al. (1995) observaram que *Pseudomonas* spp. podem favorecer o desenvolvimento de micorrizas na rizosfera de feijão.

2.5 Situação Atual

Atualmente existem alguns relatos da utilização de produtos comerciais a base de RPCPs. A China, por exemplo, possui um elaborado sistema de produção e distribuição de RPCPs para os agricultores. Entretanto, esses produtos só foram lançados no mercado depois que a sua eficácia ficou bem estabelecida em experimentos regionais e após caracterização da ecologia microbiana (CHEN *et al*., 1996).

No Brasil ainda não há produtos comerciais com RPCPs registrados .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram amostradas plantas em 8 propriedades agrícolas, em condições variadas, no município de Campinas. Em todas as propriedades buscou-se amostrar alface (*Lactuca sativa*) e mais uma ou duas espécies vegetais, cultivadas ou não. As plantas foram retiradas do solo com um pouco de solo aderido às raízes, colocadas em sacos plásticos identificados e levadas ao laboratório. Na tabela 1 observa-se informação sobre os locais e plantas amostradas.

Tabela 1 - Informações sobre os locais de amostragem, espécies e quantidades de plantas amostradas.

Propriedades	**Plantas coletadas**	**Nº de plantas**	**Características do solo**
Matão	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Rúcula (*Eruca sativa*)	10	
	Salsa (*Petrosolium sativum*)	10	
Boa Esperança	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Rúcula (*Eruca sativa*)	10	
	Salsa (*Petrosolium sativum*)	10	
São Gonçalo	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Rúcula (*Eruca sativa*)	10	
	Salsa (*Petrosolium sativum*)	10	
Sta. Genebra	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Rúcula (*Eruca sativa*)	10	
	Salsa (*Petrosolium sativum*)	10	
Guará	Alface crespa 'Vera'	3	Argiloso; rotação de cultura com milheto.
	Alface americana 'Lucy Brown'	3	
	Chicória (*Chicorium endivia*)	3	
São Marcos	Alface crespa 'Vera'	3	Antes da alface, cultivo de couve por mais de 10 anos.
	Alface americana 'Lucy Brown'	3	
	Tiririca (*Cyperus rotundus*)	3	
São José	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Chicória 'Eros'	10	
	Salsa	10	
Amarais	Alface crespa 'Vera'	10	Tabela 2
	Rúcula 'Royal'	10	
	Chicória	10	

Tabela 2 - Características químicas dos solos amostradas

Propriedades	M.O. g/dm^3	PH $CaCl_2$	V %	K	Ca	Mg	H+Al	S.B.	CTC	P	Zn	B	Cu	Fe	Mn
				----------mmol$_c$.dm^{-3}----------						----------mg.dm^{-3}----------					
Matão	39	6,4	86	4,9	89	29	20	122,9	143,1	479	13,9	0,53	9,2	77	8,6
Boa Esperança	46	6,0	76	5,0	70	13	28	88,0	115,8	511	24,1	0,42	23,0	121	24,8
São José	50	6,1	86	5,8	145	21	28	171,8	199,6	878	16,0	0,70	15,0	161	10,9
Amarais	53	6,3	86	9,3	117	25	25	151,3	176,3	647	12,7	0,65	14,1	73	13,7
São Gonçalo	74	5,7	85	11,8	185	20	38	216,8	254,9	924	24,9	0,81	12,3	152	24,6
Sta Genebra	40	5,4	59	4,7	37	8	34	49,7	84,0	159	6,4	0,37	8,4	54	11,1

3.2 Contagem das Bactérias Presentes nas Raízes

Foram feitas as contagens de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* e de bactérias do gênero *Bacillus* por diluição em série, em placas com meio B de KING et al. (1954) e BDA respectivamente.

3.2.1 Contagem de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*

Cada amostra constituiu-se de uma raiz inteira que foi separada da planta, agitada vigorosamente para desprender o solo que estava frouxamente aderido e colocada em frasco de Erlenmeyer contendo solução salina esterilizada (solução tampão de $MgSO_4$. $7H_2O$ 0,01M). A partir daí prepararam-se diluições em série de fator 10 da suspensão de solo obtida.

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura B de KING et al. (1954) e espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski em duplicata. As placas foram mantidas a 28-30ºC por 24 horas. Consideraram-se como de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* as colônias que fluoresceram sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta.

3.2.2 Contagem de bactérias do gênero *Bacillus*

O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito acima, só que a suspensão de solo obtida pela agitação das raízes foi posta em banho-maria a 80ºC por 20 minutos, antes de se prepararem as diluições em série. A contagem das colônias que cresceram em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) foi feita após incubação a 28ºC por 48 horas.

3.3 Obtenção dos Isolados

Os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram obtidos após a contagem dessas bactérias, quando se escolheram, aleatoriamente, algumas colônias que fluoresceram sob luz com comprimento próximo do ultravioleta. As colônias selecionadas foram purificadas pelo método do esgotamento por estria, em placa de Petri contendo meio B de King sólido. Após 24 horas de incubação a 28-30ºC, foram obtidos os isolados.

Os isolados de *Bacillus* spp. foram obtidos de forma semelhante. As colônias selecionadas foram purificadas em meio de cultura BDA e incubadas por 48 horas a 28ºC.

Efetuou-se teste de coloração de Gram para todos os isolados. Somente foram preservados os isolados que apresentaram resultados Gram positivo para *Bacillus* e Gram negativo para *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Todos os isolados foram preservados em geladeira a 5ºC, em tubos de ensaio contendo meio de cultura B de King sólido, para conservação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e BDA para *Bacillus* spp. Colocou-se uma camada de óleo mineral esterilizado em cada tubo.

Tabela 3 - Quantidade de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. amostrados de cada rizosfera.

Origem	Isolados	
	Pseudomonas fluorescentes	*Bacillus* spp.
Alface crespa	19	18
Salsa	15	7
Rúcula	10	4
Chicória	6	4
Tiririca	-	2
Total	50	35

3.4 Identificação de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes por Testes Bioquímicos

Os isolados fluorescentes de *Pseudomonas* spp. foram classificados quanto à espécie com base em PALLERONI (1984), por meio dos testes bioquímicos citados abaixo, num total de onze variáveis.

A produção de gelatinase, catalase e dihidrolase da arginina, a redução de nitrato e a reação à gema de ovo foram verificadas pelos métodos descritos por LELLIOTT et al. (1966). Verificou-se a produção de fenazina (pigmento azul) em meio de cultura A de KING et al. (1954). A habilidade de utilizar D-trehalose e L-triptofano como fonte de carbono para crescimento foi detectada pelo método de LEMANCEAU et al. (1995). Avaliou-se ainda a utilização de citrato como fonte de carbono pelo método de SIMMONS (1926) e o crescimento a 41ºC e a 4ºC como descrito por STANIER et al. (1966).

3.5 Identificação de *Bacillus* spp. por Testes Bioquímicos

Para a identificação de *Bacillus* spp. também se utilizaram os métodos indicados por PALLERONI (1984), num total de 24 testes, conforme descrito abaixo.

Primeiramente os isolados foram avaliados quanto a sua relação com o oxigênio livre, tendo sido classificados em aeróbios restritos, anaeróbios restritos ou facultativos. Com esse objetivo, foram preparados tubos de ensaio em duplicata contendo o meio de cultura de HUGH & LEIFSON (1953). Os isolados foram cultivados nesses tubos e a um deles adicionou-se uma camada superficial de 3 cm de vaselina fundida estéril, para criar a condição de anaerobiose. Os tubos foram mantidos em incubadora a 25-28ºC, por 3 dias. Os resultados do teste foram avaliados pela mudança de cor do meio de azul para amarelo, pelo corante azul de bromotimol:

a) Mudança de cor nos dois tubos onde a bactéria foi semeada caracterizou uma bactéria anaeróbia facultativa (metabolismo fermentativo e oxidativo);

b) Mudança de cor somente no tubo que não recebeu a camada de vaselina caracterizou uma bactéria aeróbia obrigatória e

c) Mudança de cor somente no tubo que recebeu a camada de vaselina caracterizou uma bactéria anaeróbia obrigatória.

A produção de catalase, dihidrolase de arginina, gelatinase e tirosinase, a reação à gema de ovo e a redução do nitrato foram avaliadas pelos métodos descritos por LELLIOTT et al. (1966). A avaliação do crescimento a 3ºC, 45ºC, 50ºC, 60ºC e 75ºC e da hidrólise de amido seguiu os procedimentos descritos por STANIER et. al (1966).

Para a determinação da produção de ácido a partir de manitol, lactose, arabinose, inositol, frutose e glicose foi utilizado o meio de cultura descrito por PALLERONI (1984), trocando-se a glicose pelos diferentes açúcares citados acima.

Avaliou-se a utilização de citrato como fonte de carbono como descrito por SIMMONS (1926).

Avaliou-se, ainda, o crescimento em meio nutriente-ágar (NA) com 2%, 5 %, 7% de NaCl e crescimento em meio NA com 25 mg/L de estreptomicina.

3.6 Avaliação da Solubilização de Fosfato, Produção de Ácido Indol Acético e Ácido Cianídrico por *Pseudomonas* spp. Fluorescentes e *Bacillus* spp em Diferentes Rizosferas

Para a avaliação da solubilização de fosfato, produção de ácido indol acético e ácido cianídrico por *Pseudomonas* spp. fluorescentes e *Bacillus* spp. foram utilizados alguns dos isolados cuja obtenção foi descrita no item 3.3, originários da rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória, e mais 8 isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes provenientes da rizosfera de citros, previamente estudados por FREITAS & VILDOSO (2004).

Para a avaliação da habilidade de produzir ácido cianídrico utilizou-se o método proposto por BAKKER & SCHIPPERS (1987). Para as bactérias fluorescentes de *Pseudomonas* spp., transferiu-se um isolado por placa contendo meio B de King suplementado com 4,4 g de glicina por L. A glicina estimula a produção de HCN. A placa foi invertida e colocou-se o papel de filtro impregnado com a solução de ácido pícrico a 0,5% (amarelo) e Na_2CO_3 a 2% na tampa da placa. As placas foram seladas com parafilme e mantidas a 28-30ºC por 24 horas. A mudança da coloração do papel de filtro de amarelo para marrom-alaranjado indicou a produção de HCN. Para *Bacillus* spp. utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima, com a diferença de que o meio de cultura utilizado foi o de tripticaseína de soja-ágar diluído 10 vezes.

Para a produção de ácido indol acético, utilizou-se o método adaptado por CATTELAN et al. (1999). As bactérias foram transferidas para placas contendo meio de tripticaseína de soja diluído 10 vezes, acrescido de 15 g de ágar por litro de água destilada e enriquecido com 5 mM de L-triptofano (1,021 g L^{-1}). O triptofano é o precursor do AIA. Transferiram-se 12 isolados por placa, foram cobertos com membrana de nitrocelulose (45 mm de diâmetro) e incubou-se a 28°– 30° C por 24h. Após esse período, a membrana foi removida para outra placa, saturada com a solução de Salkowski (1 mL da solução de $FeCl_3.6H_2O$ 0,5 M, em 50 mL de $HClO_4$ 35%) e

incubada à temperatura ambiente. Os isolados que formaram halo avermelhado na membrana, no período entre 30 minutos e 2 horas, foram produtores de AIA.

Para a solubilização de fosfato, foi utilizado o método proposto por KATZNELSON & BOSE (1959), que considera a habilidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico na forma de $CaHPO_4$. Utilizou-se o seguinte meio de cultura: 1% de glicose, 2% de ágar, 0,2 % de asparagina, 0,05%, de $MgSO_4$, 0,01% de NaCl, 0,01% KCl e 0,05% de extrato de levedura para um litro de água destilada. O meio foi esterilizado e, após atingir 50°C, adicionaram-se 50 mL da solução esterilizada de 10% K_2HPO_4 e 100 mL de solução esterilizada de 10% $CaCl_2$ para produzir um fino precipitado de $CaHPO_4$. A reação do meio foi então ajustada para pH 7,0 com NaOH 1N esterilizado e verteu-se o meio imediatamente. Transferiram-se até 25 isolados por placa de Petri e incubou-se a 28°C-30°C, por sete dias. As colônias que formaram halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfatos.

A quantidade e a origem dos isolados bacterianos submetidos aos testes bioquímicos descritos neste item estão informadas na tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade e origem dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes e de *Bacillus* spp. testados.

Origem	Isolados	
	Pseudomonas spp. fluorescentes	*Bacillus* spp.
Alface crespa	19	18
Salsa	10	7
Rúcula	15	4
Chicória	5	4
Tangerina ‘Cleópatra’	4	-
Limão ‘Cravo’	4	-
Total	57	33

3.7 Análises Estatísticas

Para os dados de contagem de unidades formadoras de colônias (ufcs) de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. fluorescentes, a análise estatística foi feita após transformação dos dados originais para log x, uma vez que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias do erro experimental, indicados pelo teste da razão máxima (teste F máximo) de HARTLEY (1953). Após a transformação dos dados, foi feita a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de contagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes das propriedades Matão, Boa Esperança, São Gonçalo e Santa Genebra foram analisados conjuntamente, pois as espécies amostradas (alface crespa cultivar Vera, rúcula e salsa) foram as mesmas nas quatro propriedades.

Para a análise dos dados de diversidade fenotípica utilizou-se a análise estatística multivariada. Para isso utilizou-se a distância Euclidiana e o agrupamento dos isolados foi feito pelo método do vizinho mais próximo. Para avaliar a existência de correlação entre as características dos isolados e a origem utilizou-se análise por componentes principais.

Foi feita, também, análise da distribuição de *Pseudomonas putida* nas diferentes rizosferas, pelo teste de qui-quadrado.

As análises de agrupamento foram feitas em duas fases. Na primeira estimou-se uma medida de dissimilaridade entre os isolados e na segunda, desenvolvida a partir da primeira, empregou-se uma técnica de identificação e agrupamento dos isolados pela similaridade. A medida de dissimilaridade utilizada foi a distância Euclidiana.

A análise multivariada foi feita pelo software Genes e os gráficos da análise de componentes principais, pelo Statistica.

Já para a análise da distribuição de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp produtores de HCN, AIA e solubilizadores de fosfatos em diferentes rizosferas, utilizou-se o teste de qui-quadrado (X^2).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na Rizosfera de Diferentes Plantas

Nas propriedades cujos dados foram analisados conjuntamente (Matão, Boa Esperança, São Gonçalo e Sta. Genebra) observaram-se maiores números de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface crespa em comparação com as rizosferas de rúcula e salsa. Dentre essas, a rizosfera de salsa foi a que apresentou menor número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, como mostrado pela figura 1.

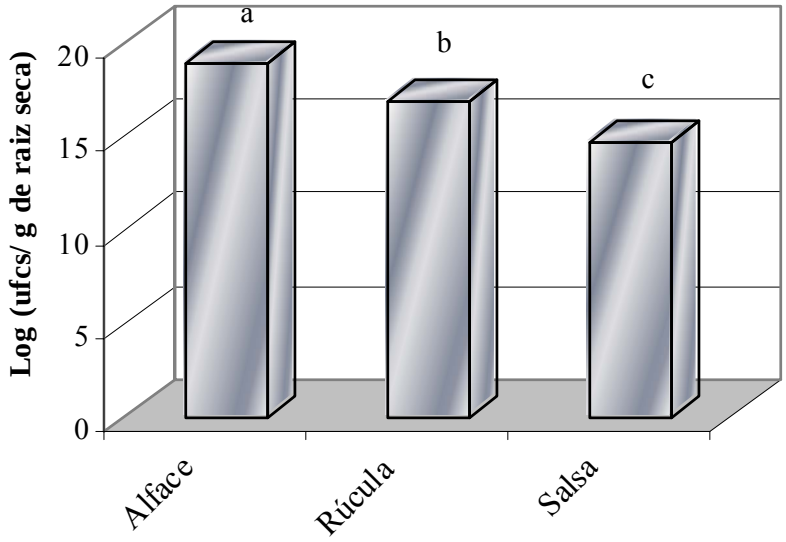

Figura 1 - Número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface, rúcula e salsa, amostradas em quatro locais: Matão, Boa Esperança, São Gonçalo e Santa Genebra. Dados analisados em conjunto, transformados em log x. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Média de dez repetições. Coeficiente de variação (CV%) = 9,63.

Pode-se supor que a rizosfera de alface, independentemente do solo, produza alguma substância benéfica às *Pseudomonas* spp. fluorescentes, composto esse ausente ou produzido em quantidade muito menor na rizosfera de rúcula e salsa. FREITAS & VILDOSO (2004) também relacionaram a produção de exsudatos radiculares com o favorecimento de bactérias fluorescentes e não fluorescentes na rizosfera de tangerina 'Cleópatra' em comparação com limão cravo.

Já na propriedade Guará foi possível comparar o número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes da rizosfera de três plantas da mesma família: alface crespa, alface americana e chicória. Observa-se que chicória e alface americana mantiveram em suas raízes quantidades significativamente diferentes de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Tabela 5). Embora essas plantas pertençam à mesma família, provavelmente se comportaram de forma diferenciada quanto à composição e quantidade de exsudatos liberados.

Tabela 5 - Número de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* nas rizosferas de alface, rúcula, salsa, chicória e tiririca em quatro locais.

Locais	**Culturas**	*Pseudomonas* spp. **fluorescentes (ufcs x 10^7.g^{-1} de raízes secas)**	**CV (%)**
Guará*	Alface crespa	8,0 ab	
	Alface americana	26,3 a	3,9
	Chicória	3,0 b	
São Marcos*	Alface crespa	0,9 ab	
	Alface americana	4,0 a	8,7
	Tiririca	0,1 b	
São José**	Alface crespa	6,0 a	
	Chicória	5,0 a	5,9
	Salsa	1,7 b	
Amarais**	Alface crespa	17,8 a	
	Chicória	4,0 b	3,5
	Rúcula	4,8 b	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
* Média de três repetições;
** Média de dez repetições

Observados como um todo, o que de mais marcante se nota nos dados apresentados na tabela 5 é o fato de que, de maneira geral, o número de bactérias fluorescente do gênero *Pseudomonas* é maior na rizosfera de alface – crespa ou americana – do que na das outras plantas, ocorrendo algumas variações quanto ao número de rizobactérias de acordo com as condições de cultivo. O número de bactérias pode variar de forma significativa em condições de campo devido ao uso de insumos, flutuações de temperatura, umidade e pH (ZAGO, 2003).

4.2 Quantificação de *Bacillus* spp. na Rizosfera de Diferentes Plantas.

Nas propriedades Guará e São Marcos não se observaram diferenças significativas quanto ao número de *Bacillus* spp. entre as rizosferas estudadas. Nas

outras propriedades, de maneira geral, o número de bactérias do gênero *Bacillus* foi significativamente maior em alface, às vezes igualando-se ao número em chicória ou em rúcula (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de *Bacillus* spp. provenientes das rizosferas de diferentes plantas em seis locais.

Locais	**Culturas**	*Bacillus* spp. **(ufcs x 10^6.g^{-1} de raízes secas)**	CV (%)
Guará*	Alface	1222 a	
	Alface americana	1530 a	6,3
	Chicória	160a	
São Marcos*	Alface	3 a	
	Alface americana	5 a	2,7
	Tiririca	3 a	
São José**	Alface	25 a	
	Chicória	31 a	5,8
	Salsa	4 b	
Amarais**	Alface	370 a	
	Chicória	192 ab	3,6
	Rúcula	170 b	
São Gonçalo**	Alface	96 a	5,7
	Rúcula	22 b	
	Salsa	3 c	
Sta. Genebra**	Alface	76 a	
	Rúcula	46 a	17,7
	Salsa	11 b	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
* Média de três repetições;
** Média de dez repetições

JJEMBA & ALEXANDER (1999) avaliaram as populações de 19 espécies bacterianas introduzidas na rizosfera de soja e observaram diferenças marcantes nos tamanhos finais de suas populações. Dessa forma, concluíram que a habilidade das bactérias em sobreviver em grandes números no solo determina seu sucesso em colonizar a rizosfera.

A habilidade das rizobactérias de sobreviver em grande número no solo é o principal determinante do seu sucesso em colonizar a rizosfera, que por sua vez pode interferir no seu potencial como promotor de crescimento de plantas, no controle biológico e como agente no controle de poluentes.

4.3 Diversidade Fenotípica de Bactérias Fluorescentes do Gênero *Pseudomonas* em Diferentes Rizosferas.

4.3.1 Identificação e distribuição dos isolados.

Para identificar os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, utilizaram-se nove testes bioquímicos, cujos resultados são apresentados na Tabela 7. Observou-se a ocorrência das seguintes espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nas rizosferas de alface, rúcula, salsa e chicória: *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* fitopatogênicas (*P. syringae* ou *P. cichori*), outras *Pseudomonas* saprófitas e *Pseudomonas* intermediária (*P. putida/ P. fluorescens*). Como intermediárias consideram-se as bactérias que, além de apresentar as mesmas característica de *P. fluorescens* , ainda utilizam D-trehalose como única fonte de carbono, assim como *P. putida*. Esse tipo intermediário entre espécies também já foi verificado por LEMANCEAU *et al*. (1995) e ZAGO (2003).

O número de *Pseudomonas putida* em relação a *Pseudomonas fluorescens* foi maior nas rizosferas de alface, salsa e chicória. Já na rizosfera de rúcula não houve diferença entre a porcentagem de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 8). Fato diferente foi observado por LATOUR et al. (1996): eles observaram que houve maior ocorrência de *P. fluorescens* do que de *P. putida* na rizosfera de linho e tomate. Dessa forma a espécie de bactéria que melhor se estabelecerá na rizosfera irá depender do tipo de hospedeiro.

Tabela 7 – Resultados dos testes bioquímicos para análise da diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

Isolados	Origem	Espécie	Ge**	4ºC	41ºC	Dt	Lt	NO_3	Ci	Da	Go	Ca
LP1	Alface	*P. fluorescens/P.putida*	-*	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP2	Alface	Outras	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
LP3	Salsa	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP4	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
LP5	Salsa	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP6	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
LP7	Rúcula	*P. fluorescens/ P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP8	Alface	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP9	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	-	+	-	-	+	+-	-	+
LP10	Alface	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
LP11	Rúcula	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP12	Alface	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP13	Alface	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP14	Salsa	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP15	Rúcula	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP16	Rúcula	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP17	Alface	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP18	Rúcula	*P. fluorescens/P.putida*	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
LP20	Alface	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP21	Alface	*P.* fitopatogênico	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
LP22	Chicória	*P. fluorescens*	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
LP23	Chicória	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP24	Chicória	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP25	Alface	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+-	+	+
LP26	Alface	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP27	Alface	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
LP28	Alface	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP29	Chicória	*P. putida*	+-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP30	Salsa	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP31	Rúcula	*P. fluorescens/P.putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP32	Rúcula	*P.* fitopatogênica	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
LP33	Alface	Outras	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
LP34	Chicória	Outras	+	+	+	+	-	+	+	+-	-	+
LP35	Chicória	*P. fluorescens*	+	+	-	+	-	+	+	+-	-	+
LP36	Rúcula	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP37	Salsa	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP38	Salsa	*P. fluorescens/P.putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP39	Salsa	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP40	Rúcula	Outras	+-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
LP41	Salsa	Outras	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
LP42	Salsa	*P. putida*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LP43	Alface	*P. fluorescens/P. Putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP44	Alface	*P. fluorescens/P. Putida*	+-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LP45	Rúcula	*P. putida*	+-	+	-	-	-	+	+	+-	-	+
LP46	Rúcula	Outras	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
LP47	Rúcula	*P. putida*	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP48	Alface	Outras	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
LP49	Alface	Outras	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
LP50	Salsa	*P. putida*	+-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
LP51	Alface	*P. fluorescens/P. Putida*	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

**Ge: produção de gelatinase; 4ºC: crescimento a 4ºC; 41ºC: crescimento a 41ºC; Dt: utilização de D-trehalose; Lt: utilização de L-triptofano; NO_3: redução de nitrato; Ci: utilização de citrato; Da: produção de dihidrolase da arginina; Go: reação à gema de ovo; Ca: produção de catalase. *+: presença da característica; -: ausência da característica

A partir dos resultados deste trabalho pode-se afirmar que, provavelmente, um isolado de *Pseudomonas putida* colonizará e se desenvolverá melhor na rizosfera de alface, salsa e chicória do que um isolado de *Pseudomonas fluorescens*. Já para a rúcula, tanto um isolado de *Pseudomonas putida* como um isolado de *Pseudomonas fluorescens* poderá colonizar da mesma forma a rizosfera dessa planta, não demonstrando especificidade para o hospedeiro.

Tabela 8 - Distribuição de isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas* entre quatro espécies de plantas.

Plantas	*P. syringae, P. cichori*		*Pseudomonas fluorescens*		*P.putida*		*P. putida/P. fluorescens*		Outras	
	Nº	% do total	Nº	% do total	Nº	% do total	Nº	% do total	Nº	% do total
Alface crespa	1	5	0	0	6	32	8	42	4	21
Rúcula	1	7	3	20	3	20	6	40	2	13
Salsa	0	0	0	0	8*	80	1	10	1	10
Chicória	0	0	2	33	3	50	0	0	1	17
Total	2	4	5	10	20	40	15	30	8	16

* Um asterisco indica significância a 5%.
$x^2 = 10,31$ df=5
$X_{calc} > X_{tab}$

Os isolados de rizobactérias que colonizam uma determinada espécie vegetal em maior nível podem não ser os melhores colonizadores de uma outra espécie. Dessa forma, RPCPs podem ser específicos às espécies, específicos a cultivares ou não específicos quanto à colonização de raízes (MILLER et al., 1989)

MILLER et al. (1989) acreditam que essas diferenças acontecem devido às quantidades e composições dos exsudatos radiculares que devem variar de uma espécie para outra e mesmo de uma cultivar para outra na mesma espécie. Então as diferenças na utilização de substratos entre os isolados poderiam estar relacionadas com as diferenças na composição dos respectivos exsudatos radiculares.

Tabela 9 – Distribuição, em número e porcentagem, de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória, com base em testes bioquímicos.

Testes bioquímicos	Alface	% total	Rúcula	% total	Salsa	% total	Chicória	% total
	19	100	15	100	10	100	6	100
Gelatinase	9	47	8	53	3	30	4	67
Crescimento a 41ºC	4	21	2	13	1	10	0	0
Crescimento a 4ºC	15	79	14	93	8	80	4	67
D-trehalose	0	0	4	27	0	0	3	50
L-triptofano	0	0	0	0	0	0	0	0
Redução de nitrato	19	100	14	93	10	100	4	67
Citrato	18	95	15	100	10	100	6	100
Dihidrolase da arginina	19	100	14	93	10	100	6	100
Catalase	19	100	15	100	10	100	6	100
Fenazina	0	0	0	0	0	0	0	0
Reação à gema de ovo	10	53	9	60	1	10	2	33

Dos testes bioquímicos utilizados, os que mais contribuíram para a identificação e análise da divergência entre os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram a gelatinase e a gema de ovo (tabela 10), por terem apresentados os maiores valores de coeficiente de variação fenotípico.

Tabela 10 – Estatísticas descritivas informando os valores máximo, mínimo, médio e os coeficientes de variação fenotípica (CV) obtidos nos 9 descritores bioquímicos avaliados.

Descritores	Média	Mínimo	Máximo	CV%
Gelatinase	1,58	1,0	3,0	42,58
Crescimento a 4ºC	1,82	1,0	2,0	21,32
Crescimento a 41ºC	1,16	1,0	2,0	31,92
D-trehalose	1,14	1,0	2,0	30,75
Redução de nitrato	1,94	1,0	2,0	12,36
Citrato	1,98	1,0	2,0	7,14
Dihidrolase da arginina	2,04	1,0	3,0	19,70
Gema de ovo	1,44	1,0	2,0	34,82
Catalase	2,0	2,0	2,0	0

Embora a dihidrolase da arginina, o crescimento a 4ºC e a 41ºC e a utilização de D-trehalose como única fonte de carbono tenha contribuído em menor proporção do que a gelatinase e a gema de ovo, também foram considerados testes muito importantes para discriminação entre as bactérias. A redução de nitrato e a utilização de citrato também contribuíram, porém em menor proporção. A catalase não contribuiu para a identificação e análise da divergência dos isolados dessas bactérias (Figura 2).

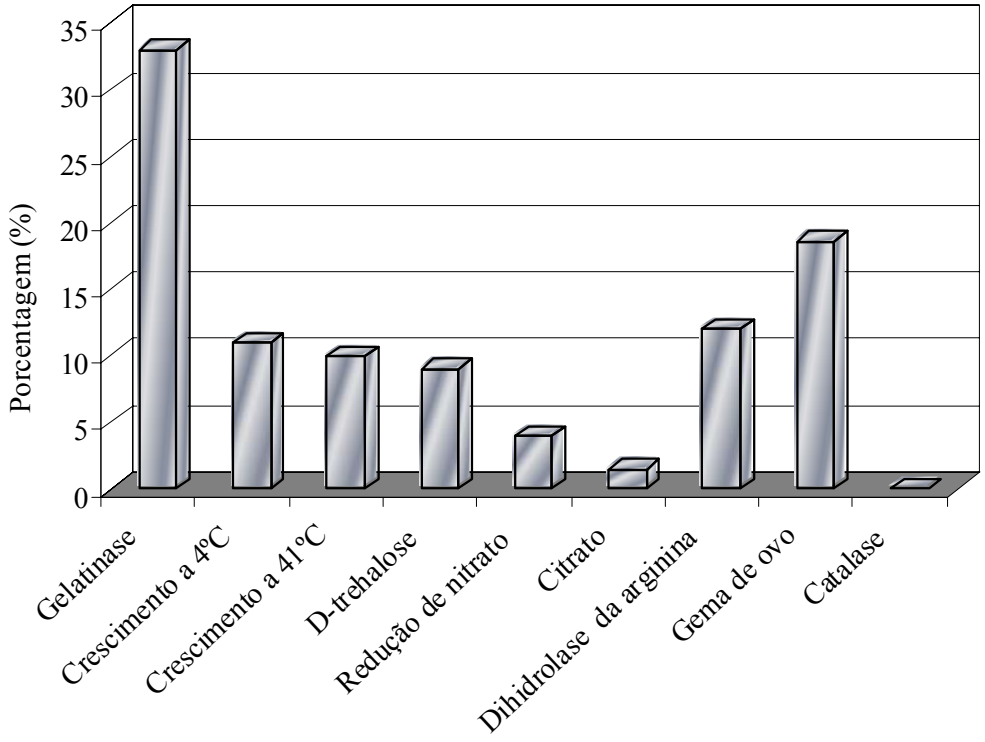

Figura 2 – Contribuição relativa de cada teste bioquímico para a identificação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

4.3.2 Divergência fenotípica por análises de agrupamento.

A avaliação da diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória foi feita pela construção de um dendrograma pela distância Euclidiana; agrupou-se pelo método do vizinho mais próximo (Figura 3). O nível de dissimilaridade alcançou de 0 a 100% e os isolados que mostraram um nível de similaridade maior que 80% foram agregados em grupos de similaridade (“clusters”). Dos 50 isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, 38 foram agrupados em 6 grupos. As origens e classificações taxonômicas dos isolados pertencentes a cada grupo estão na tabela 11

De maneira geral, somente os isolados classificados como *Pseudomonas* fitopatogênica (*P. syringae* e *P. cichori*) não foram agrupados.

Isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes da rizosfera de alface, rúcula e salsa foram incluídos nos mesmos grupos com mais freqüência, demonstrando características similares. Isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes da rizosfera de salsa (100%) foram agrupados com mais freqüência do que isolados de alface (74%), rúcula (73%) e chicória (50%) (Tabela 11). Esses dados indicam que a diversidade entre isolados de salsa foi menor do que entre isolados de alface, rúcula e chicória, sugerindo que a salsa exerce uma pressão seletiva mais forte. Menor diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes também foi encontrada na rizosfera de tomate comparada com a de linho por LEMANCEAU et al. (1995). Assim, diferentes espécies de plantas podem diferir no grau e na maneira como influenciam a comunidade microbiana na rizosfera. SMALLA et al. (2001) observaram que as comunidades microbianas na rizosfera de batata e colza foram mais semelhantes entre si do que quando comparadas com a rizosfera de morango.

A análise da distribuição desses isolados em diferentes agrupamentos em função da sua origem forneceu evidências de que a espécie de planta – algumas mais do que outras – tiveram seletiva influência na comunidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

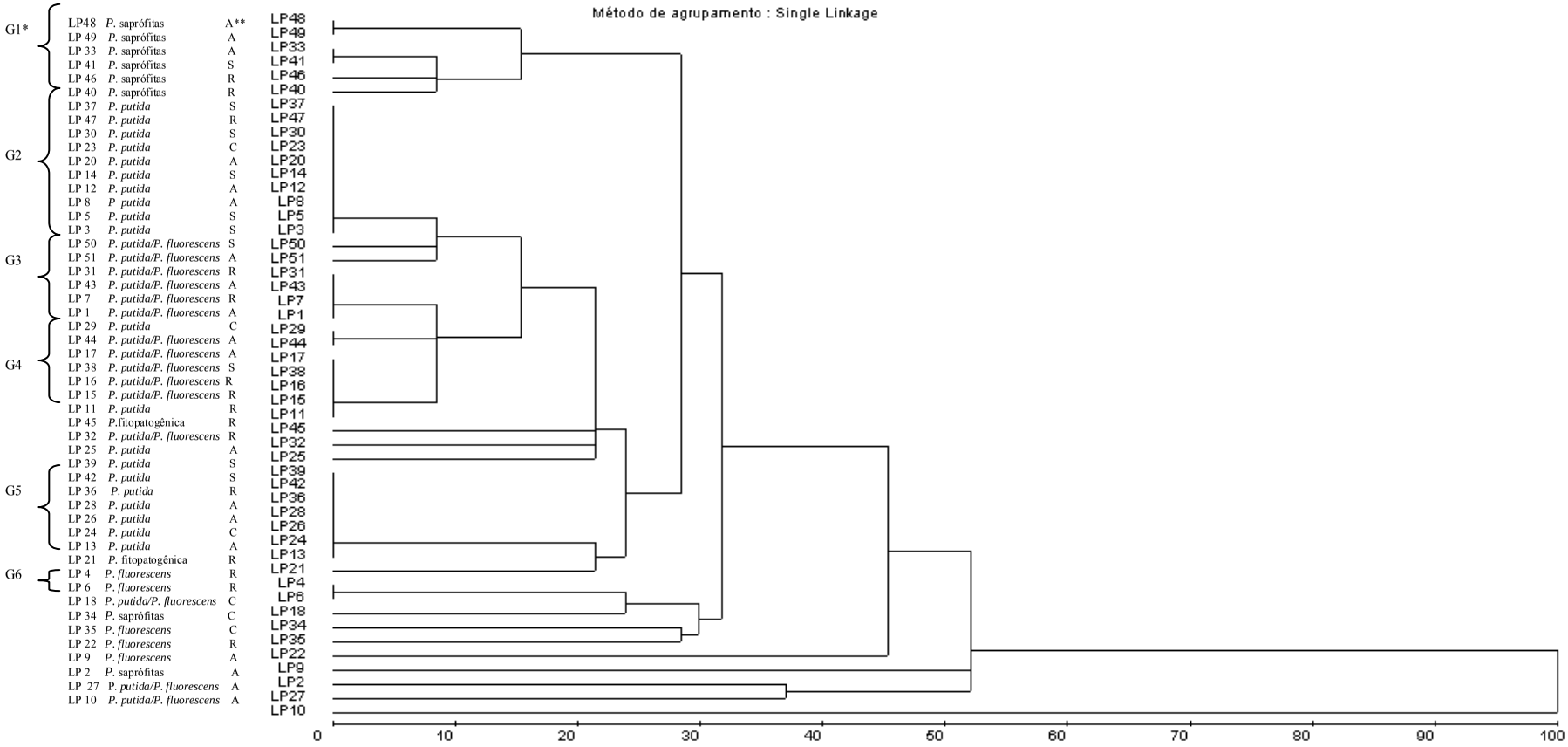

Figura 3 - Dendrograma dos dados fenotípicos de *Pseudomonas* sp. fluorescentes, obtidos da rizosfera de ** alface (A), rúcula (R), salsa (S) e chicória (C), * G1: grupo 1, G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4, G5: grupo 5 e G6: grupo 6. (Todos os descritores)

Tabela 11 – Agrupamento de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes de acordo com sua similaridade.

Grupos	Plantas				Predominância no grupo
	Alface (19)*	Rúcula (15)	Salsa (10)	Chicória (6)	
1 (6)**	3	2	1	0	*P.*saprófitas
2 (10)	3	1	5	1	*P. putida*
3 (6)	3	2	1	0	*P.putida/P. fluorescens*
4 (7)	2	3	1	1	*P.putida/P.fluorescens e P.putida*
5 (7)	3	1	2	1	*P. putida*
6 (2)	0	2	0	0	*P. fluorescens*
Número de isolados agrupados	14	11	10	3	
(% do total)	74 %	73%	100%	50%	

* Número total de isolados

** Número de isolados em cada grupo

4.3.3 Divergência fenotípica por análise de componentes principais

A análise de componentes principais foi utilizada para verificar a existência de correlação entre as características dos isolados bacterianos com a origem. Os dois primeiros componentes principais absorveram 46,75 % de toda a variação (Figura 4).

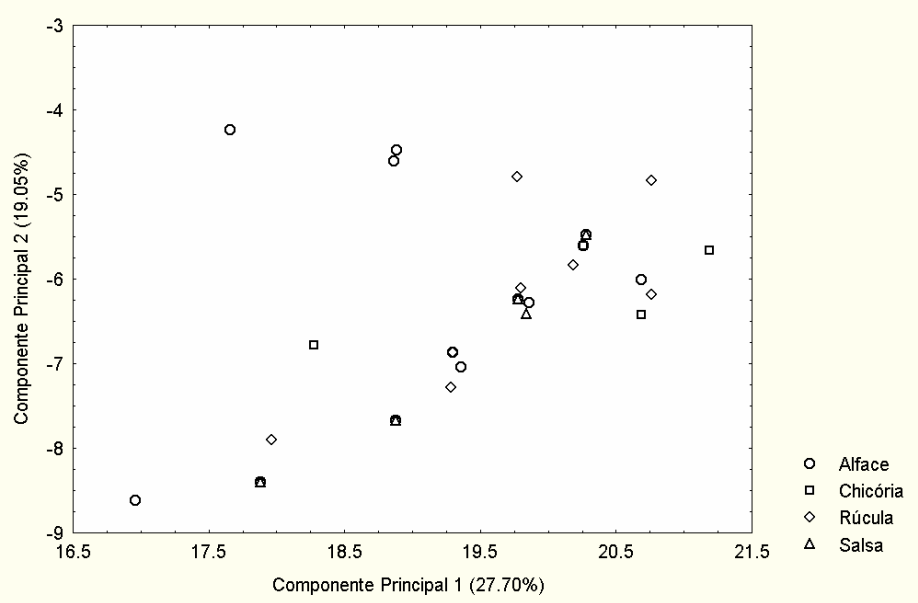

Figura 4 – Análise por componentes principais de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, obtidos da rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória (todos os descritores).

Observa-se pela figura 4 que a distribuição de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no plano foi aleatória, ou seja, não houve a formação de agrupamentos.

Com isso, pode-se afirmar que as características dessas bactérias foram semelhantes entre as quatro plantas estudadas.

4.3.4 Descartes dos testes bioquímicos redundantes por componentes principais

A análise por componentes principais permitiu identificar os testes bioquímicos redundantes, ou seja, que pouco influenciaram na discriminação dos isolados. Para isso, foram consideradas as correlações entre os mesmos, assim como a importância biológica para a identificação bacteriana. O descarte dos testes bioquímicos redundantes permitiu a otimização do conjunto original.

Somente foram descartadas duas variáveis: primeiramente a catalase e em seguida o citrato. O descarte ocorreu porque essas variáveis foram redundantes e apresentaram maior valor no último componente principal (Tabela 12).

Tabela 12 – Estimativa dos coeficientes de ponderação relacionados aos últimos componentes principais de 9 testes bioquímicos avaliados em 50 isolados de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* spp.

	ÚLTIMOS COMPONENTES PRINCIPAIS	
Variáveis	9	8
Gelatinase	0,0948	-0,3738
Crescimento a 4Cº	-0,0223	0,0851
Crescimento a 41Cº	0,0302	-0,0211
D-trehalose	0,0153	0,1886
Redução de nitrato	-0,2657	-0,2145
Citrato	-0,5155	**0,5743**
Dihidrolase da arginina	-0,2107	0,5043
Gema de ovo	-0,2083	-0,4323
Catalase	**0,7518***	---

* Valores em negrito representam o maior valor no último componente, indicando a redundância do teste bioquímico.

4.4 Diversidade Fenotípica de Bactérias do Gênero *Bacillus* spp. na Rizosfera de Diferentes Plantas.

4.4.1 Identificação e distribuição dos isolados.

Tabela 13 - Testes bioquímicos para identificação de *Bacillus* spp.

Isolado	Origem	Identificação	Respiração			Crescimento a ºC					NaCl (%)			O	G	D	T	Ácido a partir de açúcares**:					
			A*	An	F	3	45	50	60	75	2	5	7					M	AR	G	F	L	I
LB1	Alface	*Bacillus circulans*			+[a]	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
LB2	Alface	*B. subtilis*			+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
LB3	Alface	*B. racemilacticus*			+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
LB4	Alface	*B. circulans*			+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
LB5	Alface	*Bacillus spp.*	+			+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
LB6	Alface	*B. polymyxa*			+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB7	Salsa	*B. racemilacticus*			+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB8	Salsa	*B. racemilacticus*			+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
LB9	Chicória	*B. megaterium*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
LB10	Chicória	*B. racemilacticus*			+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB11	Rúcula	*B. cereus ou B. thuringiensis*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+-	-	+	-	-	+	-	-	-
LB12	Alface	*B. firmus*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	-	+	-	-	+
LB13	Alface	*B. megaterium*			+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB14	Alface	*B. megaterium*		+		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB15	Alface	*B. spp.*			+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+-	-	+	+	-	+	-	-	+
LB16	Alface	*B. cereus ou B. thuri*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+-	-	+	-	-	+	-	-	+
LB17	Alface	*B.megaterium*			+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB18	Alface	*B. megaterium*	+			+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
LB19	Alface	*B. megaterium*			+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
LB20	Chicória	*Bacillus Circulans*			+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+-	+	+	+	+	+	-	+	+
LB21	Chicória	*B. stearothermophis*			+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	-	-	+
LB22	Tiririca	*Bacillus megaterium*			+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
LB23	Tiririca	*B. megaterium*	+			+	+	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	-	+	+	+	+	+
LB24	Alface	*B. megaterium*			+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
LB25	Alface	*B. megaterium*	+			+	+	-	-	-	+	+	-	-	+-	+	+	+	+	+	-	-	+
LB26	Alface	*B. subtilis*	+			+	+	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	-	+	+	+	+	+	+
LB27	Alface	*Bacillus megaterium*			+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	+	-	+
LB28	Salsa	*B. megaterium*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	+	-	+
LB29	Salsa	*Bacillus spp.*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+-	+	+	-	+	+	+	-	+
LB30	Salsa	*Bacillus megaterium*			+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	+	+	+
LB31	Salsa	*Bacillus spp.*			+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+-	-	+	+	+	+	+	-	+
LB32	Salsa	*B. cereus e B. thuringiensis*			+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
LB33	Rúcula	*B. spp.*			+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
LB34	Rúcula	*B. polymyxa*			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	+	+	+	+	-	+
LB35	Rúcula	*B. polymyxa*	+			+	+	+	+	+	-	-	-	-	+-	-	+	+	+	+	+	-	+

*A: Aerobiose; An: Anaerobiose; F: Facultativo; O: Gema de ovo; G: Gelatinase; D: Dihidrolase da Arginina; T: tirosinase

** M: Manitol; Ar: Arabinose; G: Glicose; F: Frutose; L: Lactose; I: Inositol

[a]+: presença da característica; -: ausência da característica

A identificação dos isolados de *Bacillus* spp. foi feita com base nos testes bioquímicos apresentados na tabela 13. O crescimento em estreptomicina e a hidrólise de amido foram negativos para todos os isolados e a produção de catalase, a utilização de citrato e a redução do nitrato foram positivas para todos os isolados e não são apresentados na tabela.

A indicação das espécies de *Bacillus* spp. encontradas nas rizosferas de alface, rúcula, salsa e chicória se encontra na tabela 14.

Na rizosfera de alface, as bactérias encontradas com maior freqüência foram *Bacillus megaterium* (44%); na rizosfera de salsa, as espécies mais comuns foram *Bacillus megaterium* (29%) e *Bacillus racemilacticus* (29%). Já para rúcula foi *Bacillus polymyxa* (50%). Na de chicória as bactérias mais comuns foram *Bacillus megaterium* (25%), *Bacillus circulans* (25%), *Bacillus stearothermophilus* (25%) e *Bacillus racemilacticus* (25%) (Tabela 14). De maneira geral, a bactéria mais comum foi *Bacillus megaterium,* como também observado por CATTELAN (1998) na rizosfera de soja e em solo não rizosférico.

Tabela 14 - Características de isolados obtidos em cada espécie vegetal (número e porcentagem em relação ao total).

Plantas	Isolados	* B.		B. m		B.c		B.f		B. St		B. Sub		B. r		B. p		B.cer e B.th	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Alface crespa	18	2	11	8	44	2	11	1	5,5	0	0	2	11	1	5,5	1	5,5	1	5,5
Salsa	7	2	29	2	29	0	0	0	0	0	0	0	0	2	29	0	0	1	14
Rúcula	4	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	50	1	25
Chicória	4	0	0	1	25	1	25	0	0	1	25	0	0	1	25	0	0	0	0
Tiririca	2	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	35	5	14	13	37	3	8,6	1	3	1	3	2	6	4	11	3	8,6	3	8,6

B: *Bacillus* spp.; B.m*: Bacillus megaterium*; B.c: *Bacillus circulans*; B.f: *Bacillus firmus*; B. st: *Bacillus stearothermophilus*; B. sub: *Bacillus subtilis*; B. r*: Bacillus racemilacticus*; B. p: *Bacillus polymyxa*; B.cer e B.th: *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*

Tabela 15 – Valores máximos, mínimos e média e o coeficiente de variação fenotípico (CV), para os 20 descritores bioquímicos avaliados na identificação de *Bacillus* spp.

Descritores	Média	Mínimo	Máximo	CV%
Aeróbios	1,7	1,0	2,0	32,64
Anaeróbios	1,03	1,0	2,0	16,43
Facultativos	1,8	1,0	2,0	22,55
Crescimento a 3ºC	1,83	1,0	2,0	20,91
Crescimento a 45ºC	1,74	1,0	2,0	25,44
Crescimento a 50ºC	1,37	1,0	2,0	35,75
Crescimento a 60ºC	1,34	1,0	2,0	35,86
Crescimento a 2 % NaCl	1,08	1,0	2,0	26,16
Crescimento a 5 % NaCl	1,91	1,0	2,0	14,84
Crescimento a 7 % NaCl	1,91	1,0	2,0	14,84
Gema de ovo	1,83	1,0	2,0	20,91
Gelatinase	1,23	1,0	2,0	34,68
Dihidrolase da arginina	1,11	1,0	2,0	28,97
Tirosinase	1,71	1,0	2,0	26,74
Manitol	1,8	1,0	2,0	22,55
Arabinose	1,86	1,0	2,0	19,12
Glicose	1,97	1,0	2,0	8,57
Frutose	1,34	1,0	2,0	35,86
Lactose	1,23	1,0	2,0	34,68
Inositol	1,97	1,0	2,0	8,57

Tabela 16 – Distribuição, em número e porcentagem, de *Bacillus* spp. isolados da rizosfera de diferentes plantas com base em testes bioquímicos

Testes bioquímicos	Alface	%	Salsa	%	Rúcula	%	Chicória	%	Tiririca	%
Aeróbio restrito	4	22	0	0	1	25	0	0	1	50
Anaeróbio restrito	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Facultativo	13	67	7	100	3	75	4	100	1	50
Gelatinase total	8	44	2	29	1	25	1	25	1	50
Gelatinase parcial	10	55	5	71	3	75	3	75	1	50
Crescimento a 3 a 5ºC	16		5	71	4	100	2	50	2	100
Crescimento a 45ºC	14	78	5	71	3	75	2	50	2	100
Crescimento a 50ºC	8	44	1	14	2	50	1	25	1	50
Crescimento a 60ºC	7	39	1	14	1	25	1	25	1	50
Crescimento a 75ºC	0	0	1	14	1	25	1	25	0	0
NaCl 2%	18	100	7	100	2	50	3	75	2	100
NaCl 5%	18	100	2	29	2	50	4	100	2	100
NaCl 7%	14	78	2	29	2	50	4	100	2	100
Redução de nitrato	18	100	7	100	4	100	4	100	2	100
Citrato	18	100	7	100	4	100	4	100	2	100
Dihidrolase da arginina	2	11	0	14	1	25	1	25	0	0
Catalase	18	100	7	100	4	100	4	100	2	100
Reação à gema de ovo	5	28	1	5,5	2	11	0	0	0	0
Tirosinase	12	67	7	100	2	50	3	75	2	100
Hidrólise de amido	18	100	7	100	4	100	4	100	2	100
Streptomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arabinose	15	83	6	86	3	75	4	100	2	100
Manitol	16	89	5	71	2	50	4	100	1	50
Glicose	17	94	6	86	4	100	4	100	2	100
Frutose	3	17	5	71	3	75	0	0	1	50
Lactose	3	17	2	29	1	25	1	25	1	50
Inositol	18	100	7	100	3	75	4	100	2	100

De maneira geral, a maioria dos testes bioquímicos foi importante, necessário e contribuiu para a identificação e análise da divergência de isolados de *Bacillus* spp. Os testes bioquímicos com menor contribuição relativa foram a produção de ácido a partir de glicose e de inositol e a anaerobiose (Figura 5).

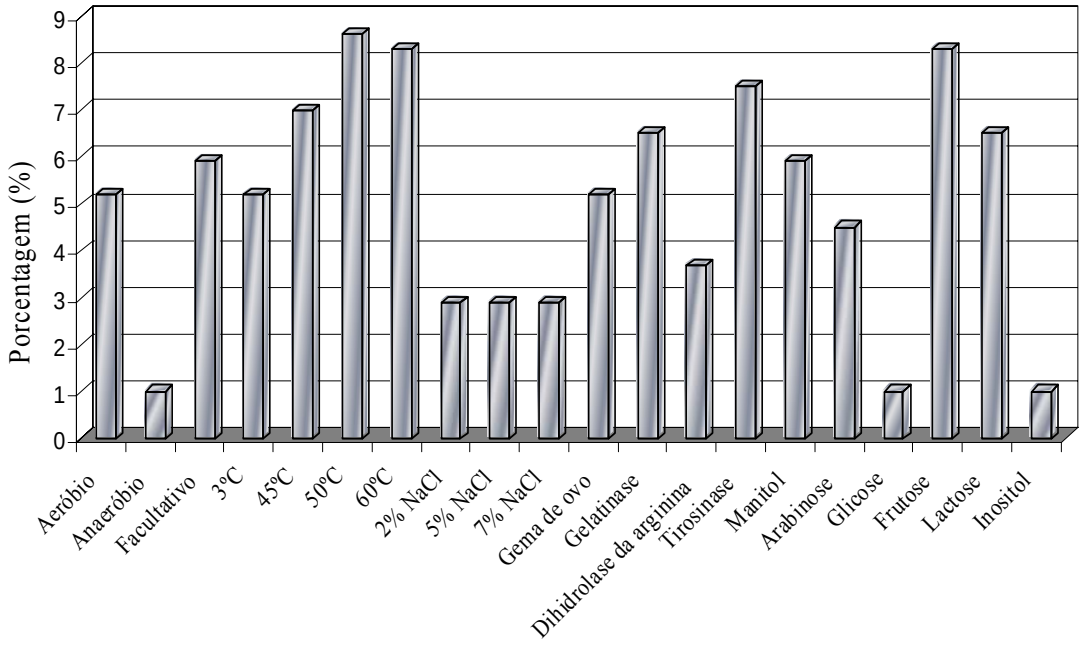

Figura 5 – Contribuição relativa de cada teste bioquímico para identificação e avaliação da divergência de *Bacillus* spp.

4.4.2 Divergência fenotípica por análises de agrupamento.

Para avaliar a diversidade dos isolados de *Bacillus* spp. da rizosfera de alface, rúcula, salsa, chicória e tiririca, construiu-se um dendrograma (Figura 6) com base na análise numérica dos testes bioquímicos apresentados na tabela 15 menos os descritores considerados redundantes (Tabela 18). Os isolados que mostraram um nível de similaridade de até 80 % foram agregados em grupos de similaridade.

Dos 35 isolados de *Bacillus* spp., 19 foram agrupados em 6 grupos. Alguns grupos incluíram somente isolados de alface e salsa (grupo 4) ou isolados de alface e tiririca (grupo 6) (Tabela 17). Isolados de *Bacillus* spp. da rizosfera de alface (72%) e tiririca (100%) foram agrupados com mais freqüência do que isolados de salsa (57%) (Tabela 17) e não houve agrupamento entre isolados de rúcula e chicória. Isso indica que a diversidade entre isolados de alface e tiririca foi menor do que entre os isolados de rúcula, salsa e chicória.

Tabela 17 - Origem e classificação taxonômica de isolados de *Bacillus* spp. distribuídos em quatro grupos de acordo com a similaridade entre os isolados.

Agrupamentos	Plantas					Predominância no grupo
	Alface (18)*	Rúcula (4)*	Tiririca (2)*	Salsa (7)*	Chicória (4)*	
1 (6)**	3	0	1	2	0	*B. megaterium*, *Bacillus* spp.
2 (2)**	2	0	0	0	0	*B. subtilis*, *B. megaterium*
3 (2)**	2	0	0	0	0	*B. circulans*
4 (4)**	2	0	0	2	0	*B. racemilacticus* *Bacillus* spp.
5 (3)**	3	0	0	0	0	*B. firmus*, *B.spp.*, *B. cereus/B. thuring.*
6 (2)**	1	0	1	0	0	*B. subtilis*, *B. megaterium*
Número de isolados agrupados (% do total)	13 72 %	0 0 %	2 100%	4 57%	0 0%	

* Número total de isolados

** Número de isolados em cada grupo

Devido às variações na exsudação radicular, diferentes espécies de plantas crescendo no mesmo tipo de solo selecionam comunidades divergentes de bactérias (KOWALCHUK et al., 2002; WIELAND et al., 2001).

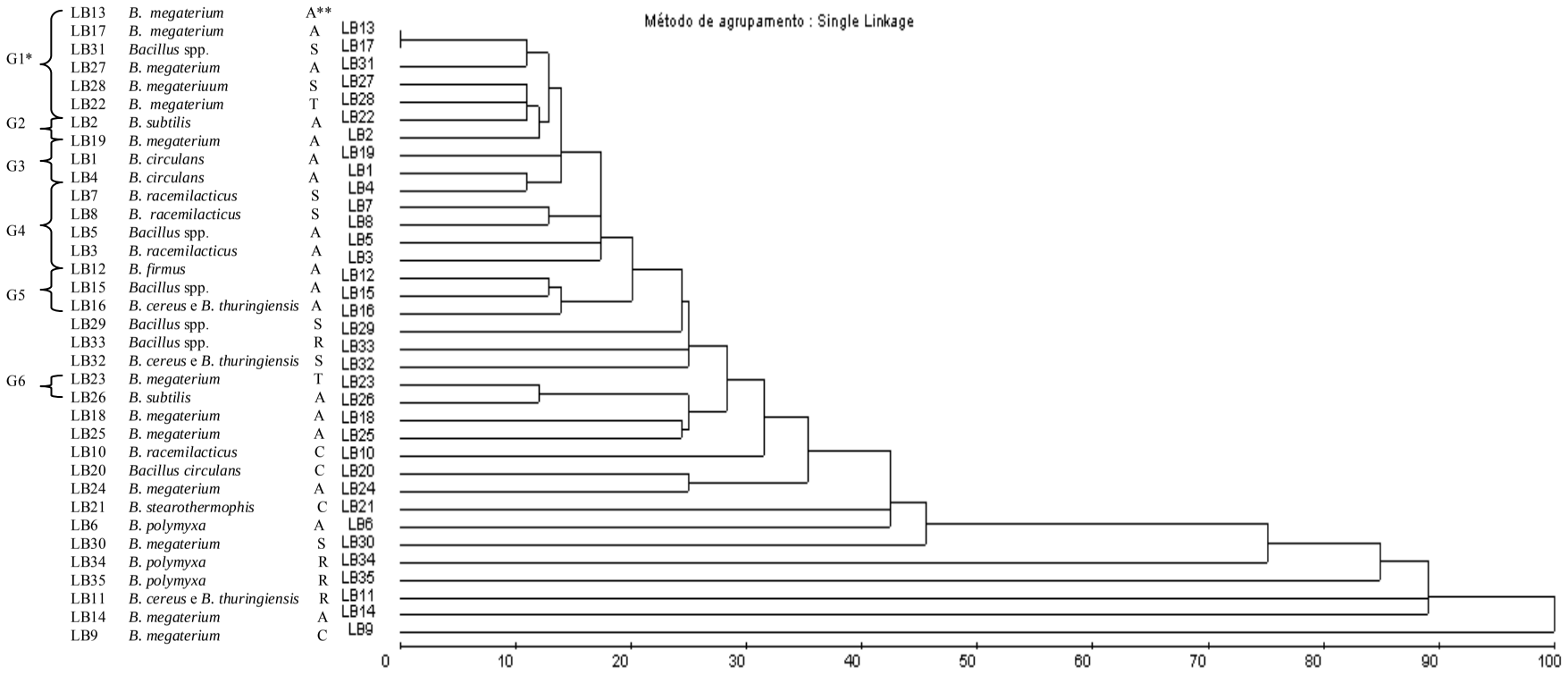

Figura 6 - Dendrograma dos dados fenotípicos de *Bacillus* spp., obtidos da rizosfera de alface ** (A), rúcula (R), salsa (S), chicória (C) e tiririca (T); * G1: grupo 1, G2: grupo 2, G3:grupo 3; G4: grupo 4, G5: grupo 5, G6: grupo 6. **(Com descarte dos descritores redundantes)**

4.4.3 Divergências fenotípicas por análise de componentes principais

Foi feita a análise por componentes principais a partir da matriz de dissimilaridade da distância Euclidiana. Os dois primeiros componentes absorveram 29,3 % da variação total.

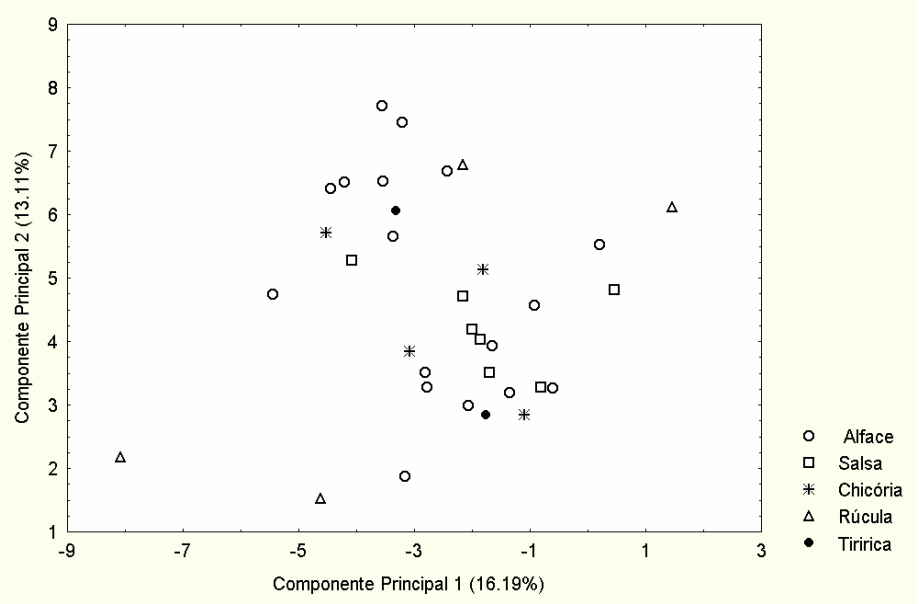

Figura 7 – Análise por componentes principais de isolados de *Bacillus* spp. obtidos da rizosfera de alface, rúcula, salsa, chicória e tiririca considerando-se todos os descritores.

As características das espécies de *Bacillus* spp. foram semelhantes entre as quatro rizosferas avaliadas, pois pela observação da distribuição dos isolados pelo plano de componentes principais observou-se que esses isolados não puderam ser agrupados em função da origem.

4.4.3.1 Descartes dos testes bioquímicos redundantes por componentes principais

O primeiro descarte foi para a variável anaerobiose facultativa (Tabela 18). O descarte ocorreu porque o teste bioquímico apresentou-se redundante para identificação de bactérias do gênero *Bacillus* spp. e por ter o maior valor no último componente. O segundo teste bioquímico descartado foi o crescimento a 45ºC, com elevado valor no último componente. O descarte seguinte foi o teste bioquímico crescimento a NaCl 5%.

O quarto e último descarte foi a produção de gelatinase. Não houve mais descartes por falta de consistência dos dados e baixa correlação.

Tabela 18 – Estimativa dos coeficientes de ponderação relacionados aos últimos componentes principais, referente a 20 testes bioquímicos avaliados em 35 isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp.

Variáveis	20	19	18	17
Aeróbio	0,0823	0,0083	0,3741	-0,1742
Anaeróbio	0,0837	0,1001	-0,1159	0,3238
Facultativo	**0,3918***	---	---	---
Crescimento a 3ºC	0,0367	0,0912	-0,0018	-0,3302
Crescimento a 45ºC	-0,1825	**-0,7621**	---	---
Crescimento a 50ºC	0,3876	0,5313	-0,0291	-0,1667
Crescimento a 60ºC	0,2944	0,1204	-0,0387	0,1239
Crescimento a 2% NaCl	-0,2591	0,0632	-0,0381	0,3362
Crescimento a 5% NaCl	-0,3385	-0,0353	**0,5674**	---
Crescimento a 7% NaCl	-0,2119	-0,0527	-0,402	0,1942
Gema de ovo	-0,1329	0,1694	-0,0023	0,3504
Gelatinase	-0,1103	-0,0901	-0,0479	**0,4291**
Dihidrolase da arginina	-0,107	-0,0021	-0,0768	-0,1518
Tirosinase	0,3467	0,0209	-0,5154	-0,2629
Manitol	0,311	0,1852	0,2622	0,3162
Arabinose	0,0272	0,0715	-0,029	0,1506
Glicose	-0,0154	-0,0789	0,0539	-0,0852
Frutose	-0,1682	-0,0261	-0,1791	0,128
Lactose	0,2114	0,04	-0,3002	-0,0135
Inositol	-0,1023	-0,1041	0,4612	-0,1278

* Valores em negrito representam o maior valor no último componente, indicando a redundância do teste bioquímico.

O número de *Pseudomonas putida* em relação a *Pseudomonas fluorescens* foi maior nas rizosferas de alface, salsa e chicória. Esses resultados demonstram a inexistência de especificidade dessa bactéria com relação às três plantas descritas acima. Fato semelhante foi observado por VILLACIEROS et al. (2003) que observaram que o número de células de um determinado isolado de *P. fluorescens* na rizosfera de alfafa foi semelhante ao das rizosferas de tomate e ervilha e, principalmente, em beterraba açucareira, espécie a partir da qual a bactéria foi inicialmente isolada. Isso indicou que a bactéria pode colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, não existindo, dessa forma, especificidade para um único hospedeiro.

O favorecimento de uma determinada espécie fluorescente de *Pseudomonas* spp. depende das características do solo e da espécie de planta. CLAYS-JOSSERAND et al. (1995) observaram que o número de *P. fluorescens* foi maior na região da rizosfera de tomate do que em solos sem cultivo e que o contrário aconteceu com *P. putida.* A

rizosfera de tomate pode ter liberado alguma substância que favoreceu o desenvolvimento de *P. fluorescens* em relação a *P. putida*.

A diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes entre isolados de salsa foi menor do que nas outras plantas. Isso sugere que salsa exerce uma seleção mais forte. Quanto à diversidade de *Bacillus* spp. observou-se que a diversidade foi menor entre isolados de alface e tiririca.

A habilidade das rizobactérias em utilizar fontes de carbono específicas pode ser uma importante característica na seleção de microrganismos, que pode ser entendida como diversidade funcional, definida como número, tipos, atividades e taxas em que um conjunto de substratos é utilizado pela comunidade microbiana (ZAK *et al*., 1994).

Esse fato é muito importante para produção de inoculantes bacterianos, pois quando um determinado isolado é introduzido na rizosfera, se ele for hábil em utilizar uma fonte de carbono dos exsudatos radiculares ou apresentar algum mecanismo que favoreça o seu estabelecimento na rizosfera, teria uma vantagem competitiva sobre as bactérias do solo sem essa habilidade. Dessa forma o desenvolvimento das bactérias presentes no inoculante seria favorecido (LEMANCEAU et al., 1995).

4.5 Avaliação da Produção de Ácido Cianídrico, Ácido Indol Acético e Solubilização de Fosfatos por *Pseudomonas* spp. Fluorescentes.

Produção de ácido cianídrico, ácido indol acético e habilidade de solubilizar fosfatos são importantes mecanismos de RPCPs para promover o crescimento de plantas. Por isso, avaliou-se a habilidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em produzir esses metabólitos secundários (Tabela 19).

Tabela 19 - Produção de HCN e AIA e solubilização de fosfato por *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de diferentes plantas.

Isolados	Origem	Identificação	HCN	AIA	Solubilização de fosfato
LP1	Alface	*P.fluorescens/P.putida*	+*	-	+
LP2	Alface	Outras	+	+	-
LP3	Salsa	*P. putida*	-	+	-
LP4	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	-
LP5	Salsa	*P. putida*	+	-	+
LP6	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	+
LP7	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	+
LP8	Alface	*P. putida*	+	+	-
LP9	Rúcula	*P. fluorescens*	+	+	-
LP10	Alface	*P.fluorescens/P.putida*	-	+	-
LP11	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	+
LP12	Alface	*P. putida*	+	+	-
LP13	Alface	*P. putida*	-	+	-
LP14	Salsa	*P. putida*	+	+	-
LP15	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	-
LP16	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	+
LP17	Alface	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	-
LP18	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	-
LP20	Alface	*P. putida*	+	+	-
LP21	Alface	*P.* fitopatogênica	+	+	+
LP22	Chicória	*P. fluorescens*	+	+	-
LP25	Alface	*P.fluorescens/P.putida*	+	-	+
LP26	Alface	*P. putida*	-	+	-
LP27	Alface	*P.fluorescens/P.putida*	+	+	-
LP28	Alface	*P. putida*	-	-	-
LP29	Chicória	*P. putida*	+*	-	+
LP30	Salsa	*P. putida*	+	+	-
LP31	Rúcula	*P.fluorescens/P.putida*	-	+	-
LP32	Rúcula	*P.* fitopatogênica	-	+	-
LP33	Alface	Outras	+	+	-
LP34	Chicória	Outras	+	+	-
LP35	Chicória	*P. fluorescens*	+	+	-
LP36	Rúcula	*P. putida*	-	+	-
LP37	Salsa	*P. putida*	-	+	-
LP38	Salsa	*P.fluorescens/P.putida*	+	+	-
LP39	Salsa	*P. putida*	-	-	-
LP40	Rúcula	Outras	+	+	-
LP41	Salsa	Outras	+	-	-
LP42	Salsa	*P. putida*	-	-	-
LP43	Alface	*P.fluorescens/P.Putida*	+	+	+
LP44	Alface	*P.fluorescens/P.Putida*	+	+	+
LP45	Rúcula	*P. putida*	-	+	-
LP46	Rúcula	Outras	+	-	-

(Continua)

Tabela 19 - Produção de HCN e AIA e solubilização de fosfato por *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de diferentes plantas (Continuação).

Isolados	Origem	Identificação	HCN	AIA	Solubilização de fosfato
LP47	Rúcula	*P. putida*	+	+	-
LP48	Alface	Outras	+	-	+
LP49	Alface	Outras	+	+	+
LP50	Salsa	*P. putida*	+	-	+
LP51	Alface	*P.fluorescens/P.Putida*	+	-	+
Ps 60	Tangerina	NI	-	-	-
Ps 62	Tangerina	NI	-	+	-
Ps 63	Tangerina	NI	-	+	-
Ps 65	Tangerina	NI	-	+	-
Ps 72	Limão	NI	-	+	-
Ps 74	Limão	NI	-	+	-
Ps 76	Limão	NI	-	-	-
Ps 77	Limão	NI	-	-	-

*+: presença da característica; -: ausência da característica.
**NI: Não incluído nos testes para identificação.

A porcentagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA não foi significativamente influenciada pelo tipo de planta (Tabela 20). Sabe-se que a maioria dos isolados de rizobactérias produz AIA na rizosfera de diferentes plantas, sendo que a grande variação não está tanto no número de produtores e sim na quantidade de AIA produzida (MORDUKHOVA et al., 1991 citado por CATTELAN, 1998). Além disso, a produção dessas substâncias por rizobactérias está diretamente ligada à disponibilidade de exsudatos radiculares (MELO, 1998), sendo que já se observou que *Pseudomonas* spp. fluorescentes produziram AIA em resposta aos exsudatos de raiz de milho (BENIZRI *et al*., 1997).

Tabela 20 - Distribuição de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA, HCN e solubilizadoras de fostato na rizosfera de diferentes plantas e análise desta distribuição por tabela de contingência e teste de X^2

Plantas	Nº	AIA[a]			HCN[b]			SolP[c]		
		N de isolados		% do	N de isolados		% do	N de isolados		% do
		O**	E	total	O	E	total	O	E	total
Alface	19	13	12	68	14	12	74	8	5	42
Rúcula	15	9	9,5	60	11	9,5	73	4	4	27
Salsa	10	5	6	50	6	6	60	2	3	20
Chicória	4	3	2,5	75	4	2,5	100	1	1	25
Tangerina	4	3	2,5	75	0*	2,5	0	0	1	25
Limão	4	2	2,5	50	0*	2,5	0	0	1	25
Total	57				37			15		

* Um asterisco indica significância a 5%.
** O: Observados E: Esperados
[a] $x^2 = 1,8$ df=5
[b] $x^2 = 17,51$ df=5
[c] $x^2 = 5,44$ df=5

Quanto à solubilização de fosfato, RODRIGUES & FRAGA (1999) observaram que bactérias do gênero *Pseudomonas, Bacillus* e *Rhizobium* possuem alto potencial para essa característica.

De acordo com MULDER et al. (1969), citados por CATTELAN (1998), dentre os principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato estão a produção de CO_2 e ácidos orgânicos. A produção desses ácidos demanda níveis mais altos de carboidratos do que o solo pode fornecer. Provavelmente essa é a razão porque a maioria das bactérias solubilizadoras é encontrada na rizosfera, onde o nível de carboidrato é alto (SPERBER, 1958). Embora no presente trabalho, o número de solubilizadores de fosfato tenha sido relativamente diferente entre as rizosferas (Figura 8), essa diferença não foi significativa (Tabela 20). Dessa forma pode-se afirmar que, provavelmente, a quantidade de carboidrato liberada por essas rizosferas foi relativamente igual entre elas.

A produção de HCN pelas RPCPs parece ser um fenômeno bastante comum. Esse metabólito, derivado da glicina, além de apresentar propriedades inibidoras de patógenos, também pode promover o crescimento das plantas diretamente, aumentando o desenvolvimento dos pêlos radiculares (LUZ, 1996). A glicina pode ser encontrada nos exsudatos radiculares de muitas plantas e poderia provavelmente estar disponível na rizosfera como um precursor para a síntese de HCN por rizobactérias.

Observou-se que as bactérias produtoras de HCN ocorreram em números significativamente menores na rizosfera de citros em comparação com a rizosfera de

hortaliças. A rizosfera de hortaliças pode ter liberado alguma substância que favoreceu o desenvolvimento de produtores de HCN (Figura 8).

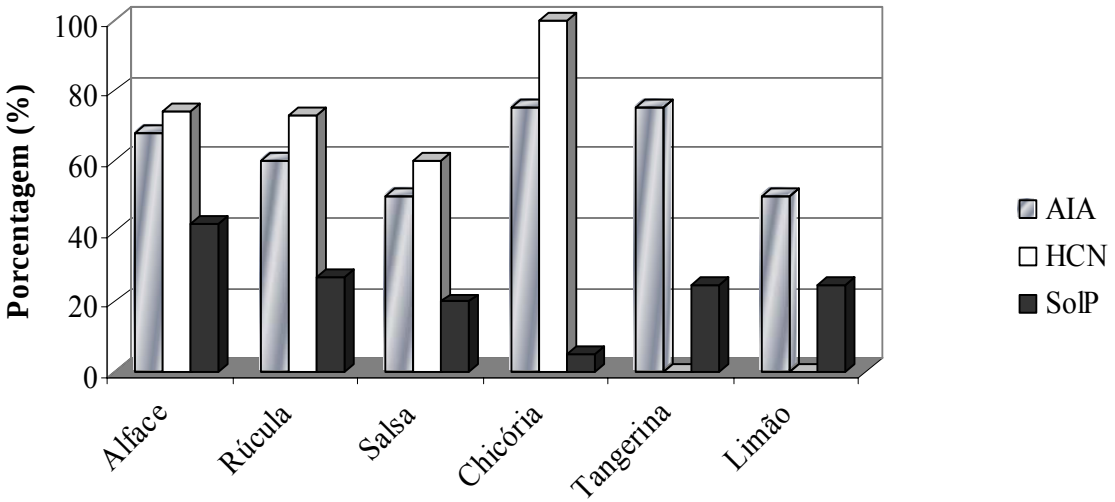

Figura 8 – Porcentagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA e HCN e solubilizadoras de fosfato (SolP) na rizosfera de diferentes plantas.

4.6 Avaliação da Produção de Ácido Cianídrico, Ácido Indol Acético e Solubilização de Fosfatos por *Bacillus* spp.

Avaliou-se a habilidade de *Bacillus* spp. em produzir ácido indol acético, HCN e solubilizar fosfatos e os resultados desses testes estão na Tabela 21.

Tabela 21 - Produção de HCN e AIA e solubilização de fosfato por *Bacillus* spp. na rizosfera de diferentes plantas.

Isolados	Origem	Identificação	HCN	AIA	SolP
LB1	Alface	*Bacillus circulans*	-*	+	-
LB2	Alface	*B. subtilis*	-	-	-
LB3	Alface	*B. racemilacticus*	-	+	+
LB4	Alface	*B. circulans*	-	-	-
LB5	Alface	*Bacillus spp.*	-	-	-
LB6	Alface	*B. polymyxa*	-	+	-
LB7	Salsa	*B. racemilacticus*	-	-	-
LB8	Salsa	*B. racemilacticus*	-	-	-
LB9	Chicória	*B. megaterium*	-	-	-
LB10	Chicória	*B. racemilacticus*	-	+	-
LB11	Rúcula	*B. cereus ou B. thuri*	-	+	-
LB12	Alface	*B. firmus*	-	-	-
LB13	Alface	*B. megaterium*	-	-	+
LB14	Alface	*B. megaterium*	-	-	-
LB15	Alface	*B. spp.*	-	+	-
LB16	Alface	*B. cereus ou B. thuri*	-	-	+
LB17	Alface	*B.megaterium*	-	+	-
LB18	Alface	*B. megaterium*	-	-	-
LB19	Alface	*B. megaterium*	-	-	-
LB20	Chicória	*Bacillus circulans*	-	+	-
LB22	Tiririca	*Bacillus megaterium*	-	-	-
LB23	Tiririca	*B. megaterium*	-	-	-
LB24	Alface	*B. megaterium*	-	-	-
LB25	Alface	*B. megaterium*	-	+	-
LB26	Alface	*B. subtilis*	-	-	+
LB27	Alface	*B. megaterium*	-	-	-
LB28	Salsa	*B. megaterium*	-	+	-
LB29	Salsa	*Bacillus spp.*	-	+	+
LB30	Salsa	*B. megaterium*	-	+	-
LB31	Salsa	*Bacillus spp.*	-	+	-
LB32	Salsa	*B. cereus e B. th*	-	-	-
LB33	Rúcula	*Bacillus spp.*	-	-	-
LB34	Rúcula	*Bacillus polymyxa*	-	-	-
LB35	Rúcula	*B. polymyxa*	-	-	-

*+: presença da característica; -: ausência da característica.

Não foram encontradas bactérias do gênero *Bacillus* spp. produtoras de HCN e o número de solubilizadores de fosfato foi relativamente pequeno nas rizosferas de alface, rúcula, salsa e chicória.

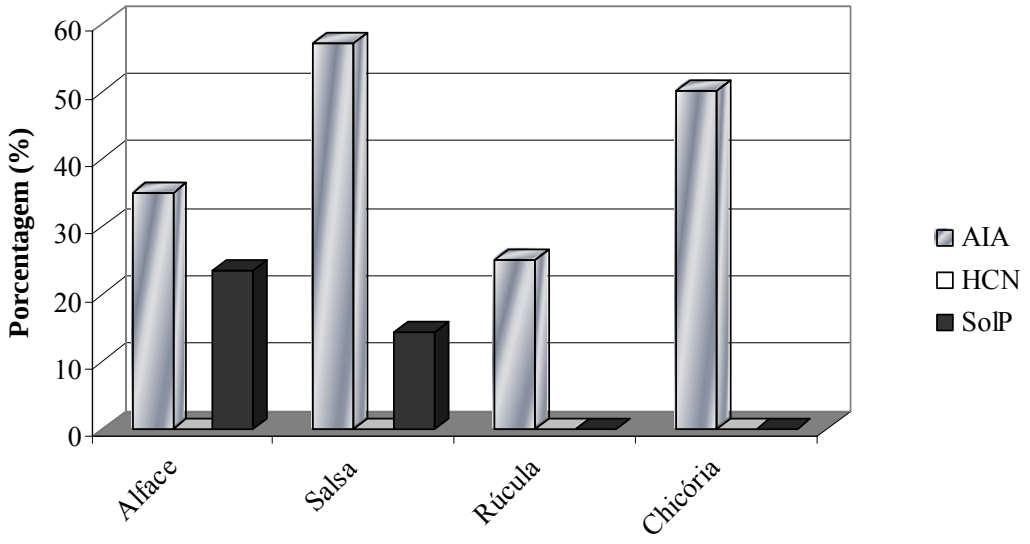

Figura 9 – Porcentagem de *Bacillus* spp. produtores de AIA, HCN e solubilizadores de fosfato (SolP) na rizosfera de alface, salsa, rúcula e chicória.

O número de bactérias produtoras de ácido indol acético foi semelhante nas rizosferas de alface, salsa, rúcula e chicória (Tabela 22).

Tabela 22 - Distribuição de isolados de *Bacillus* spp. produtores de AIA na rizosfera de alface, rúcula, salsa e chicória e análise dessa distribuição por tabela de contingência e teste de X^2.

Plantas	Nº de isolados testados	AIA		
		N de isolados		% do total
		Observado	Esperado	
Alface	18	6	7,09	33
Rúcula	7	4	2,76	57
Salsa	4	1	1,58	25
Chicória	4	2	1,58	50
Total		11		

X^2=2,7 P=0,05

$X_{calc} < X_{tab}$

A porcentagem de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de AIA e solubilizadoras de fosfato não foi significativamente influenciada pelo tipo de planta. Entretanto, bactérias produtoras de HCN ocorreram em números significativamente menores na rizosfera de citros em comparação com a rizosfera de hortaliças. A rizosfera de hortaliças pode ter liberado alguma substância que favoreceu o desenvolvimento de

produtores de HCN ou as plantas de citros por serem espécies perenes, tipo C3, e apresentarem crescimento mais lento, podem ter liberado menos carbono na rizosfera desfavorecendo o desenvolvimento de produtores de HCN. GRAYSTON et al. (1998) observaram menor diversidade de rizobactérias em plantas perenes em relação a plantas anuais e relacionaram esse fator a menor quantidade de exsudatos radiculares liberada.

Assim pode-se afirmar que a quantidade e a diversidade de rizobactérias pode variar significativamente com relação à espécie de planta, sendo altamente influenciada pela composição dos exsudatos radiculares (BAIS et al., 2004; KRAVCHENKO et al., 2003; GRAYSTON et al., 1998; MAHAFFEE & KLOEPPER, 1997; LATOUR et al., 1996; CLAYS-JOSSERAND et al., 1995; LEMANCEAU et al., 1995).

Embora a influência do solo não tenha sido avaliada neste estudo, sabe-se que esse fator, juntamente com a planta, é um dos principais responsáveis pela variação da diversidade (LATOUR et al., 1996). Dessa forma, mais estudos são necessários para determinar como as características dos solos interferem na seleção de bactérias pela planta hospedeira.

4.7 Comparação entre os testes estatísticos utilizados

Para avaliação da diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. nas diferentes rizosferas, utilizaram-se os métodos estatísticos: análise multivariada por meio do agrupamento dos isolados de acordo com a similaridade fenotípica (distância euclidiana e agrupamento pelo método do vizinho mais próximo), análise por componentes principais e teste de qui-quadrado.

Embora o teste de qui-quadrado (X^2) tenha sido utilizado para avaliar se a distribuição de *Pseudomonas* spp. fluorescentes varia significativamente com relação ao tipo de planta, esse não é o teste estatístico mais indicado quando se tem um pequeno número de amostras (GOMES, 1976). Assim, o melhor método estatístico empregado para avaliar a diversidade foi a análise multivariada por meio do agrupamento dos isolados de acordo com a similaridade fenotípica, que permitiu a identificação das rizosferas que apresentaram menor diversidade e, assim, maior especificidade.

Com relação à análise por componentes principais, observa-se que a distribuição de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e de *Bacillus* spp. no plano foi aleatória, ou seja, não houve a formação de agrupamentos. Com isso, pode-se afirmar que as características dessas bactérias foram semelhantes entre as quatro plantas estudadas.

Resultado semelhante foi obtido por GRAYSTON et al. (1998), que, ao utilizarem análise por componente principal, não encontraram uma boa separação entre as bactérias da rizosfera de trigo, centeio, trevo e grama quanto à utilização de fontes de carbono. Contudo, ao utilizarem análise de variação canônica com base na intensidade das cores correspondentes a cada fonte de carbono contida nas placas do "kit" comercial "Biolog", observaram diferenças quanto ao padrão de utilização das fontes de carbono e, assim, uma discriminação clara entre as amostras das diferentes rizosferas.

Além disso, a avaliação por componentes principais foi importante na identificação dos testes bioquímicos que realmente contribuíram para a identificação e avaliação da diversidade de bactérias. O interesse nessa avaliação está na possibilidade de se descartarem caracteres que contribuam pouco para a discriminação dos genótipos avaliados, reduzindo, dessa forma, mão-de-obra, tempo e custos dispendidos, na experimentação agrícola (CRUZ & REGAZZI, 1997).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelo presente trabalho permitem concluir que:

a) Bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* desenvolvem-se em maior número na rizosfera de alface em comparação com as rizosferas de rúcula e salsa.
b) A diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi menor na rizosfera de salsa que na das outras plantas estudadas.
c) A diversidade de *Bacillus* spp. foi menor na rizosfera de alface e salsa.
d) O número de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de HCN foi influenciado pelo tipo de planta
e) O número de *Bacillus* spp. não foi influenciado pelo tipo de planta.

6 REFERÊNCIAS

ANDERSON, A.J. Isolation from root and shoot surfaces of agglutinins that show specificity for saprophytic pseudomonads. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 3438-3443, 1983.

ARKHIPOVA, T.N.; VESELOV, S.U.; MELENTIEV, A.I.; MARTYNENKO, E.V. ;. KUDOYAROVA, G.R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil,** v. 272, p. 201–209, 2005.

ASGHAR, H.N ; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M ; KHALIQ, A**.** Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231–237, 2002.

BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry,** v. 19, p.451-457, 1987.

BAIS, H.P.; PARK, S.W.; WEIR, T.L; CALLAWAY, R.M; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, p.26-32, 2004.

BENIZRI, E.; SCHOENY, A.; PICARD, C.; COURTADE, A.; GUCKERT, A. External and internal root colonization of maize by two pseudomonads strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Current Microbiology**. v.34, p.297-302, 1997.

BOLDT, T. S.; JACOBSEN, C. S. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. **FEMS-Microbiology Letters**, v. 161, n.1, p. 29-35, 1998.

BUNDY, J.G.; PATON, G.I; CAMPBELLA, C.D. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p.1149–1159, 2004.

CARDOSO, E.J.B.N; FREITAS, S.S. A rizosfera. Cardoso, ed. E.J.B.N; Tsai, S.M; Neves, M.C.P. In: Microbiologia do Solo-Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p (Embrapa Soja. Documentos, 139).

CATTELAN, A.J. Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth. Georgia, 1998. 89p. Tese de Doutorado – University of Georgia.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. p. 165-184. *In* UTKHEDE, R.S. & GUPTA, V.K., (eds). **Management of soil borne diseases**. Kalyani Publishers. New Delhi, India, 1996

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C.; TABACCHIONI, S. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, v.8, p. 11-18, 1998.

CHIORATO, A. F. Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico-IAC. Dissertação de mestrado, 2004. 85 f

CLAYS-JOSSERAND, A; LEMANCEAU, P.; PHILIPPOT,L., AND LENSI. Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1745-1749, 1995.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1997. 390 p.

EL-TARABILY, K. A; HARDY, G.E.ST J; SIVASITHAMPARAM, K; KURTBOKE, I. D. Microbiological differences between limed and unlimed soils and their relationship with cavity spot disease of carrots (*Daucus carota* L.) caused by *Pythium coloratum* in Western Australia. **Plant and Soil**, v. 183, n. 2, p.279-290, 1996.

FREITAS, S.S. Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**.** Piracicaba, 1994. 112p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

FREITAS, S.S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p.61-70, 2003.

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.358-364, 1997.

FREITAS, S.S; PIZZINATTO, M.A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotricum gossypii* e promoção de crescimento de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) **Summa Phytopathologica**., v. 23, p.36-41, 1997.

FREITAS, S.S.; VILDOSO, C.I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p.987-994, 2004.

FREITAS, J. R; GERMIDA, J.J. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. **Canadian Journal of Microbiology** v.36, n. 4, 265-272, 1990.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a B-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia.* **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.25, p.1211-1221, 1993.

GAMLIEL, A; KATAN, J. Suppression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized and nonsolarized soils. **Phytopathology**, v.83, n.1, p. 68-75, 1993.

GAMLIEL, A; STAPLETON, J.J. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. **Plant-Disease**, v.77, n.9, p. 886-891, 1993.

GARCIA, J.A.L; DOMENECH, J.; SANTAMARIA, C.; CAMACHO, M.; DAZA, A.; MAÑERO, F.J.G. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere**. Environmental and Experimental Botany,** v. 52, p. 239–251, 2004.

GARCÍA, J. A. L.; SCHLOTER, M.; DURKAYA,T.; HARTMANN,A.; MAÑERO, F.J. G. Colonization of pepper roots by a plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. **Biology and Fertilit of Soils,** v. 37, p. 381-385, 2003.

GARLAND, J.L. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. **Soil Biology and Biochemistry,** v.28, p. 223- 230, 1996.

GLANDORF, D. C. M.; PETERS, L.G.L; VAN DER SLUIS, I; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Crop specificity of rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p.981-989, 1993.

GLANDORF, D. C. M.; VAN DER SLUIS, I; ANDERSON, A. J.; BAKKER, P. A. H. M; SCHIPPERS, B. Agglutination, adherence, and root colonization by fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1726-1733, 1994.

GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. Nobel, Piracicaba, p. 1-430, 1976.

GOMES, A.M.A; MARIANO,R.L.R; SILVEIRA, E.B; MESQUITA,J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de Bacillus spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p.699-703, 2003.

GRAYSTON, S. J.;WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, C.A. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biololgy and Biochemistry** v. 30, n. 3. p. 369-378, 1998.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria Bacillus pumilus and Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206–211, 2001.

HARTLEY, H.O. The maximum F-ratio as a short-cert test for heterogeneity of variance. Biometrika, London, v.37, p.308-312, 1950.HUGH, R., LEIFSON, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 66, p. 24-26, 1953.

HUGH, R.; LEIFSON, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology,** v.66, p.24-26, 1953.

JJEMBA, P.K.; ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biology and Biochemistry,** v.31, n.4, p. 623-632, 1999.

JOO, G.J.; KIM, Y.M; LEE, I.J; SONG, K.S; RHEE, I.K. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus, Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnology Letters**, v.26, p.487-491, 2004.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.5, p.79-85, 1959.

KING, E.O.; WARD, M.K. e RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin**. Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KIRK, J.L; BEAUDETTE,L.A; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.169-188, 2004.

KOWALCHUK, G. A., D. S. BUMA, W. DE BOER, P. G. L. KLINKHAMER, AND J. A. VAN VEEN. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Leeuwenhoek**, v.81, p.509-521, 2002.

KRAVCHENKO, L. V.; AZAROVA, T. S.; LEONOVA-ERKO, E. I.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; MAKAROVA, N. M.; TIKHONOVICH, I. A.. Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* Strains. **Microbiology**, v. 72, n.1, p. 37-41, 2003.

KREMER, R.J; SOUISSI, T. Cyanide production by rhizobacteria and potencial for suppression of weed seedling growth. **Current Microbiology**, v. 43, p.182-186, 2001.

LATOUR, X.; CORBERAND,T.; LAGUERRE,G.; ALLARD,F.; LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type**. Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n. 7, p.2449-2456, 1996.

LELLIOTT, R.A; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A Determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**., v.29, n.3, p.470-489, 1966.

LEMANCEAU, P.; CORBERAND,T.; GARDAN,L.; LATOUR,X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS,J.M; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissinum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads**. Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, p.1004-1012, 1995.

LILJEROTH, E.; SCHELLING, G. C.; VEEN, J.A Van Influence of different application rates of nitrogen to soil on rhizosphere bacteria. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 38, n.3A, p. 255-264, 1990.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-50, 1996.

LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.3, 2001.

LYNCH, J.M; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil,** v.129, p.1-10, 1990.

MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microbial Ecology**, v**.**34, p. 210-223, 1997.

MARSCHNER, P.; GEREND, J.; SATTELMACHER, B. Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI. **Plant and Soil**, v. 215, p. 135-141, 1999.

MEHARG, A A; WYATT, C. L; THOMPSON, I. P; BAILEY, M. J; ELLIS, R. J; MAGUIRE, N. Response of soil microbial biomass to 1,2-dichlorobenzene addition in the presence of plant residues. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 8, p.1462-1468, 1998.

MELO, M.R.F; MARIANO, R.L; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica,** v.28, p.222-228, 2002

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. In: **Ecologia microbiana** - Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

MILLER, H.J.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Variation and composition of bacterial population in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology** , v.35, p. 656-660, 1989.

NEUMANN, G; TERAS, R; MONSON, L.; KIVISAAR, M; SCHAUER, F.; HEIPIEPER, H.J. Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1907–1912, 2004.

OWEN. A; ZDOR, R.. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.801- 809, 2001.

PALLERONI, N. J. Genus I *Pseudomona*s, p. 141–199. In Krieg, N. R. and Holt, J. G. (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 3rd ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant and Soil** 253: 373–379, 2003.

RAAIJMAKERS, J.M; WELLER, D.M; THOMASHOW, L.S. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 881–887, 1997.

RANGARAJAN, S; LOGANATHAN, P.; SALEENA, L.M; NAIR, S. Diversity of pseudomonads isolated from three different plant rhizospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p.742-749, 2001.

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

SAKAI, M.; OZAWA, H;; FUTAMATA, H.; MATSUGUCHI, T. Effect de calcium ion on spinach root colonization by fluorescent pseudomonads through chemotaxis **Soil Science and Plant Nutrition,** v. 42, n.2, p.323-331, 1996.

SALLES, J.F; VEEN, J. A.V; ELSAS, J.D.V. Multivariate Analyses of *Burkholderia* Species in Soil: Effect of Crop and Land Use History. **Applied and Environmental Microbiology,** v.70, n.7, p. 4012-4020, 2004.

SHARMA, A.; SAHGAL, M.; JOHRI, B.N. Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing. **Current Science**, v.85, n.8, 2003.

SICILIANO, S.D., GERMIDA, J.J., BANKS, K., GREER, C.W. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial**. Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 483–489, 2003.

SILVEIRA, A.P.D; FREITAS, S.S.;SILVA, L.R.C; LOMBARDI, M.L.C.O.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras

do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 19, p.205-211, 1995.

SIMMONS, J.S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. **Journal of infectious diseases**, v.93, p.209-241, 1926.

SMALLA K,WIELAND G, BUCHNER A, ZOCK A, PARZY J, KAISER S, ROSKOT, N, HEUER H & BERG G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis:plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.4742-4751, 2001.

SOTTERO, A, N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias.** Campinas, 2003. viii, 47 p. Dissertação (mestrado em agricultura tropical e subtropical) - Instituto Agronômico.

SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphre and soil. **Australian Journal of Agriculture Resource**, v.9, p. 778-781, 1958.

STANIER, R.Y; PALLERONI, N.J; DOUDOROFF,M. The aerobic pseudomonas: a taxonomic study**. Journal General of Microbiology**, v.43, n. 2, p.159-271, 1966.

STANIER, R.Y. Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: Mundo dos Micróbios. Cap.18, 1969.

TAVARIA. F, K; ZUBERER, D. A. Effect of low pO2 on colonization of maize roots by a genetically altered *Pseudomonas putida* [PH 6(L 1019)]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 43-49, 1998.

TEIXEIRA, D.A; ALFENAS, A.C; MAFIA, R.G; LUIZ A. MAFFIA; FERREIRA, E.M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira,** v.30, n.4, 2005.

TSAI, S. M.; BARAIBAR, A V. L.; ROMANI, V. L. M. Efeitos de fatores físicos e químicos sobre os microrganismos do solo : umidade e aeração. Cardoso, E.J.B.N; Tsai, S.M; Neves, M.C.P. In: **Microbiologia do Solo** - Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

VÁZQUEZ, M. M.; SONIA, C; AZCÓN, R; BAREA, J.M. .Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, v.15 p. 261-272, 2000.

VILLACIEROS, M; POWER, B; MARÝA S´ANCHEZ-CONTRERAS; LLORET, J.; ROKEI. ORUEZABAL; MARTAMART´ÝN ; FERNANDEZ-PIÑAS, F.; BONILLA, I; WHELAN, C.; DOWLING, D,N; RIVILLA, R.. Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and Sinorhizobium meliloti in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. **Plant and Soil,** v. 251, p. 47-54, 2003.

WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied and Environmental Microbiology,** v.67, p.5849-5854, 2001.

YAMAOKA-YANO, D.M; VALARINI, P.J. Métodos de identificação de bactérias. MELO, S, I; AZEVEDO, L, J. In: Ecologia microbiana - Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

YUEN, G.Y.; SCHROTH, M.N. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora**.** **Phytopathology,** St. Paul, v.76, n. 2, p. 176-180, 1986.

ZAGO, V.C.P. Influência de diferentes sistemas de cultivo de olerícolas na diversidade das populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Seropédica. Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2003. Tese de doutorado – UFRJ.

ZAK, J.C.; WILLING, M.R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative apporach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1101-1108, 1994