

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“EFEITO DO FÓSFORO SOBRE A INTERAÇÃO DAS  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE GUANDU  
(*Cajanus cajan*)”**

**Giovana Peroni Finger**

**Prof. Dr. Ely Nahas**

**Prof. Dr João Suzuki**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agropecuária para  
obtenção do título de Doutor

Jaboticabal – São Paulo

2002

F497e Finger, Giovana Peroni  
Efeito do fósforo sobre a interação das bactérias isoladas da rizosfera de guandu (*Cajanus cajan*) / Giovana Peroni Finger. -- Jaboticabal, 2002  
vii, 71 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002  
Orientador: Ely Nahas  
Banca examinadora: Ana Maria Rodrigues Cassiolato, Diva de Souza Andrade, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, José Moacir Marin

Bibliografia

1. Aglutinação. 2. Células rizosféricas. 3. Exsudato. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDN 576.8.095.21

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GIOVANA PERONI FINGER** - Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestre em Ciências Veterinárias pela Faculdade de Veterinária da mesma Universidade, Doutoranda em Microbiologia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. Técnica em Laboratório desde março de 1990 na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, atuando nos laboratórios de Virologia, Bacteriologia, Micologia e Protozoologia na Faculdade de Veterinária. Participou de 18 cursos de aperfeiçoamento; apresentou 10 trabalhos em Congressos, Seminários e Encontros Científicos; publicou 13 resumos em Congressos, Seminários e Encontros Científicos, tendo participado de 23; publicou 3 artigos na íntegra em revistas indexadas; realizou 2 estágios em laboratórios e 2 estágios de docência; participou como membro de Mesa Redonda no XX Congresso de Microbiologia em Salvador; recebeu bolsa de iniciação Científica por duas entidades; participou de projetos de extensão universitária e de três bancas de estágio curricular.

Para Minha Família  
Dedico

## **Agradecimentos**

A Deus pela oportunidade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ely Nahas pela confiança, amizade e oportunidade;

Ao Prof. Dr. João Suzuki pela amizade, oportunidade e apoio;

Ao meu Noivo Jorge e minha Filha Victória pela dedicação, amor e paciência;

Aos meus Pais Fausto e Rita pelo apoio, amor e desprendimento;

Aos meus Irmãos Fausto e Daniela pelo incentivo e apoio;

A Tia Mary, minha segunda Mãe pelo amor e apoio;

Aos meus parentes e amigos pelo carinho;

A família do Jorge por me acolher;

A minha amiga Eunice Leonora Chaplin pelo exemplo, força e empenho;

Aos meus amigos de Jaboticabal em especial a Luciana T. Sanomiya, Fátima A. R. Harnich, Luiz Carlos Assis, Gisele M. Andrade, Irmã Neide, Irmã Tereza e todos que colaboraram com meu trabalho e fizeram de minha estada nesta cidade um período agradável;

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Tecnologia, em especial ao Prof. Dr Pizauro, pelos ensinamentos e apoio;

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pela orientação estatística.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1-CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	
Introdução .....	01
Revisão de literatura.....	02
1. Rizosfera: conceitos e características.....	02
2. Células rizosféricas.....	04
3. Grupos bacterianos.....	05
4. Exsudato.....	06
5. Fósforo.....	08
6. Guandu.....	09
Objetivos.....	10
Referências.....	11
 <b>CAPÍTULO 2- Efeito do fósforo nas populações bacterianas da rizosfera de guandu.</b>	
Título.....	16
Resumo.....	16
Palavras-chave.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	20
1. Localização do experimento.....	20
2. Solo.....	20
2.1. Tratamento das amostras de solo.....	20
2.1.1. Calagem e adubação .....	20
3. Células rizosféricas.....	21
4. Cultivo bacteriano.....	22
5. Análise estatística.....	23
Resultados.....	23
1. Bactérias totais.....	23
2. Actinomicetos.....	25
3. Bactérias esporuladas aeróbias.....	27
4. Bactérias Gram negativas.....	29
5. Pseudomonas.....	31
6. Bactérias solubilizadoras de fosfatos.....	33
7. Distribuição dos grupos dentro das bactérias totais.....	35
Discussão.....	37
Conclusões.....	46
Referências.....	46
 <b>CAPÍTULO 3- Interação das bactérias da rizosfera de guandu com o exsudato da raiz.</b>	
Título.....	52
Resumo.....	52
Palavras-chave.....	52
Introdução.....	53

Material e Métodos.....	54
1. Solo e guandu.....	54
2. Obtenção das bactérias.....	54
3. Exsudato da raiz.....	55
4. Teste de aglutinação.....	55
5. Análise estatística.....	56
Resultados e Discussão.....	56
1. Análise dos fatores independentes.....	56
2. Análise dos fatores associados.....	60
Conclusões.....	65
Referências.....	66
Apêndice.....	69

## “EFEITO DO FÓSFORO SOBRE A INTERAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE GUANDU (*Cajanus cajan*)”

### RESUMO

Foram isoladas e quantificadas bactérias totais, actinomicetos, bactérias esporuladas aeróbias, bactérias Gram negativas, pseudomonas e bactérias solubilizadoras de fosfato de solo rizosférico de guandu cultivado em células rizosféricas, empregando meios de cultura seletivos e o método de diluição seriada. As células rizosféricas foram utilizadas para separar o solo ao redor das raízes em camadas milimétricas. Do grupo de bactérias totais 50 bactérias foram isoladas por tratamento e submetidas ao teste de aglutinação com exsudato radicular, produzido em solução nutritiva, em estado bruto ou parcialmente purificado em coluna de Sephadex. Os grupos de bactérias totais, actinomicetos e bactérias Gram negativas, sofreram aumentos significativos na presença do guandu, fósforo (P) e na menor distância das raízes. As bactérias esporuladas aeróbias diminuíram com o aumento das doses de P. O grupo das pseudomonas foi o menos representativo no solo rizosférico e as solubilizadoras de fosfato apresentaram um aumento percentual nas doses crescentes de P. O teste de aglutinação mostrou a influência da planta sobre as bactérias com a maior porcentagem de reações positivas. O P não mostrou efeito sobre as reações de aglutinação quando analisado em conjunto com os fatores planta e distância da raiz. O exsudato radicular, produzido em solução nutritiva sem P e purificado, foi o que aglutinou o maior número de bactérias da rizosfera de guandu. Os testes de aglutinação mostraram que houve interações entre as bactérias e as plantas.

**Palavras-chave:** aglutinação, actinomicetos, bactérias solubilizadoras de fosfato, células rizosféricas, exsudato, pseudomonas



**“ EFFECT OF PHOSPHORUS ON THE INTERACTION OF BACTERIA ISOLATED  
FROM RHIZOSPHERE OF PIGEONPEA (*Cajanus cajan*)”**

**Abstract**

Total bacteria, actinomycetes, aerobic sporulated bacteria, Gram negative bacteria, pseudomonas and P-solubilizing bacteria of rhizospheric soil of pigeonpea cultivated in rhizospheric cells were isolated and quantified using selective culture medium and serial dilution method. The rhizospheric cells were used to separate soil around roots into millimetric layers. From the groups of total bacteria, 50 bacteria were isolated per treatment and submitted to agglutination test using roots exudate produced into nutritive solution, crude solution or partially purified by Sephadex column. Total bacteria, actinomycetes and Gram negative bacteria presented significant increasing considering the presence of pigeonpea, phosphorus (P) and at smallest root distance. Aerobic sporulated bacteria decreased at increasing doses of P. The pseudomonas group was less representative to rhizospheric soil and those which solubilized phosphate presented an increased percentage at increasing doses of P. The agglutination test showed the influence of plant over bacteria presenting higher positive reaction percentage. It did not show effect over agglutination when analysed together with plant and root distance factors. The roots exudate produced into nutritive solution without P and purified agglutinated the highest number of bacteria of rhizospheric of pigeonpea. The agglutination test showed that there were interaction between bacteria and plants.

**Key words:** agglutination, actinomycetes, phosphate solubilizing bacteria, rhizospheric cells, exudate, pseudomonas.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **Introdução**

A rizosfera é a fração do solo sob influência do sistema radicular das plantas, e que se estende por poucos milímetros ao redor da superfície das raízes, o que dificulta a identificação dessa fração pela tênue separação entre ela e o restante do solo. Para minimizar esse problema foram desenvolvidos sistemas que permitem o crescimento de raízes em compartimentos delimitados por microtelas de nylon permeáveis à maioria das moléculas e promovem a separação física das diferentes frações de solo rizosférico.

O estudo da rizosfera com ênfase na diversidade dos grupos de microrganismos que aí se desenvolvem pode direcionar o uso de práticas ecológicas de sustentação da fertilidade do solo, bem como o controle de pragas e doenças. O desenvolvimento de sistemas sustentáveis e a implantação desse conceito na agricultura garantem a diversidade e com ela a sanidade do solo.

Os ciclos biológicos da natureza são decorrência das interações entre plantas, microrganismos e solo, influenciando na fertilidade do solo, na qualidade da água, nas inter-relações entre os microrganismos e outros parâmetros, com reflexos na produtividade agrícola. Os microrganismos do solo, em especial as bactérias, respondem prontamente às variações químicas e ambientais de qualquer natureza e podem ser usados como bioindicadores destas mudanças.

A composição química do exsudato radicular e sua influência dependem de um conjunto de fatores bióticos e abióticos processados continuamente pelas plantas que, ao reconhecê-lo, reagem metabolicamente produzindo diversas substâncias biologicamente ativas, altamente específicas e típicas de cada espécie, que são conhecidas como compostos aleloquímicos. A colonização das raízes pelas bactérias depende da natureza e do fluxo de produção destes aleloquímicos. Um teste de aglutinação bactéria-exsudato indica uma atração entre ambos e pode evidenciar uma primeira etapa da colonização das raízes.

Os macronutrientes mais requeridos pelas plantas são o nitrogênio, o potássio e o fósforo. Dentre estes, o fósforo (P) é o que a planta necessita em menor quantidade e, nos solos tropicais, devido ao fenômeno da adsorção, encontra-se menos disponível, muito embora seja um elemento essencial para o crescimento de plantas e microrganismos.

Plantas como o guandu, em resposta à carência de P no solo, exsudam ácidos orgânicos por via radicular. Especificamente, ácido piscídico que é capaz de promover uma troca iônica com o P adsorvido à grade cristalina do solo, aumentando a concentração deste elemento disponível na rizosfera dessas plantas. Essa exsudação rizosférica elevando a disponibilidade de P exerce um efeito marcante sobre a população microbiana que, por sua vez, também influencia o processo.

Devido ao e elevado grau de complexidade dos fenômenos biológicos na interface solo-raiz eles somente poderão ser melhor delineados e compreendidos com a aplicação de sistemas de alta resolução espacial entre raízes vivas e solos adjacentes, caracterizados física e biologicamente conforme o proposto no presente trabalho. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito das doses de P sobre o número e a distribuição das bactérias totais, actinomicetos, bactérias esporuladas aeróbias, bactérias Gram negativas, pseudomonas e bactérias solubilizadoras de fosfatos nas diferentes frações do solo rizosférico do guandu. Além disso, pretendeu-se a realização de testes de aglutinação com estas bactérias isoladas contra os exsudatos de raiz de guandu cultivado em solução nutritiva com e sem P, visando à identificação de uma possível interação química entre rizobactérias e raiz da planta.

## **Revisão de Literatura**

### **1. Rizosfera: conceito e características**

O termo rizosfera foi introduzido por Hiltner, em 1904 (CURL e TRUELOVE, 1986), e enfatiza o papel crítico da atividade microbiana na zona de influência do sistema radicular em função da nutrição e saúde geral das plantas. Desde então este

termo tem sido discutido prevalecendo o conceito de que a rizosfera é o local de interações biológicas mais dinâmicas e imprevisíveis, e que exerce extraordinário efeito sobre o crescimento de plantas e raízes (AIKEN e SMUCKER, 1996; HAWES et al., 1998).

A rizosfera divide-se em ectorizosfera e endorizosfera (CAMPBELL e GREAVES, 1990). A ectorizosfera compreende a rizosfera propriamente dita e o rizoplano; já a endorizosfera compreende tecido epidermal e cortical que abriga microrganismos simbióticos e patógenos (PAUL e CLARK, 1989).

O rizoplano é caracterizado pela presença do mucigel que é um material gelatinoso, originado das células superficiais da raiz, ao qual se agregam células microbianas, colóides e matéria orgânica do solo (KLEIN, 2000). Esta região encontra-se sob forte influência do exsudato radicular, que atua como fonte primária de carbono orgânico, e é enriquecido por células periféricas da coifa da raiz, que são células renováveis, vivas e que se mantêm biologicamente ativas mesmo após serem destacadas (HAWES et al., 1998). Estas células podem influenciar a expressão gênica em organismos rizosféricos, atuando como fator de seleção dos microrganismos que compartilham o espaço rizosférico (ZHU et al., 1997).

O gradiente físico-químico gerado no ambiente da rizosfera influencia a quimiotaxia e eletrotaxia, modificando tanto as propriedades intrínsecas do solo, as populações microbianas ativas, como influenciando a absorção e secreção pelas plantas. Estes gradientes estão sempre sendo modificados pelo solo, microrganismos ou planta (LYNCH, 1990). A rizosfera é um ambiente dinâmico que difere do restante do solo, pois sua extensão depende do alcance da difusão e da estabilidade química dos componentes liberados pelas raízes. No solo sob influência da exsudação radicular podem ser encontradas microcolônias sustentadas por estas substâncias solúveis que migram através do solo (BOWEN e ROVIRA, 1999). A maior parte dos microrganismos de solo, com exceção dos oligotróficos, permanece dormente até a adição de matéria orgânica através das raízes, na forma de exsudato, secreção ou lisado celular, ou então na forma gasosa como etileno e CO<sub>2</sub>, que estimulam o crescimento dos microrganismos e promovem o desenvolvimento da rizosfera (WIPPS, 1990). O carbono disponível pode

ser fator de atração quimiostática para os microrganismos invasores de raiz (CAMPBELL e GREAVES, 1990).

A rizosfera é determinada pela interação da tríade solo, planta e microrganismo. As plantas superiores fornecem substratos que geram a nutrição e o crescimento dos microrganismos através da rizodeposição. Os microrganismos, por sua vez, promovem a decomposição da matéria orgânica liberando compostos assimiláveis pelos vegetais, além das interações com outros macro e microrganismos. A principal importância do estudo da dinâmica de populações microbianas da rizosfera é a influência que exercem sobre as plantas (LYNCH, 1990).

## 2. Células Rizosféricas: modelos experimentais

A pesquisa da biologia da rizosfera tem sido dificultada pela carência de metodologias precisas para amostrar o solo rizosférico. Apesar de alguns experimentos terem sido realizados objetivando estudar a atividade microbiológica da rizosfera (NEWMAN, 1978; ROVIRA, 1979), poucos têm quantificado a atividade microbiana em relação à distância dos planos da raiz. A arbitrariedade da amostragem do solo por meio da remoção das raízes considerando rizosfera a pequena porção de solo aderida a elas, levou a evolução da metodologia no sentido de desenvolver sistemas capazes de isolar o crescimento radicular usando vários tipos de materiais desde placas metálicas até microtelas de nylon (HELAL e SAUERBECK, 1983). O sistema de rizobox descrito por Youssef e Chino (1987) foi desenvolvido para facilitar a separação do solo rizosférico. Esse sistema é constituído de vários compartimentos de solo com diferentes dimensões, separados por tela de nylon de 25 µm de poro. As plantas crescidas no compartimento central transferem gradualmente os efeitos gerados pela exsudação radicular aos solos adjacentes, distribuídos em compartimentos a diferentes distâncias do central. Youssef e Chino (1988) aperfeiçoaram o rizobox reduzindo para um milímetro o espaçamento entre os compartimentos do solo, aumentando assim a capacidade de resolução dos fenômenos rizosféricos manifestados.

Face ao interesse despertado pelos fenômenos rizosféricos, novos modelos foram sugeridos, entre os quais se destaca o modelo proposto por Hartel et al. (1989).

Objetivando estudar as interações microrganismo-raiz, os solos foram acondicionados em um sistema de copos concêntricos dividido por membranas porosas que permitem a passagem de água e de nutrientes. Este sistema permitiu observar um pequeno aumento da população ativa de pseudomonas na rizosfera em relação ao solo não-rizosférico de tomateiro.

A utilização de membranas para identificar o solo rizosférico também foi utilizada por Cheng et al. (1996), que avaliaram a atividade da respiração microbiana através da liberação de CO<sub>2</sub>, tendo comprovado que no rizoplano não há limitação da atividade respiratória em relação à disponibilidade de carbono orgânico, o que não acontece em relação à disponibilidade de minerais, que pode limitar significativamente o crescimento microbiano e suas atividades.

A necessidade de monitorar a evolução dos efeitos rizosféricos durante o crescimento das plantas, sem a perda da integridade radicular, impôs a necessidade do desenvolvimento de sistemas não destrutivos, conforme apresentado por Wenzel et al. (2001), que permitem uma resolução sub-milimétrica em termos de camadas de solos rizosféricos. Neste novo modelo de rizobox o crescimento do sistema radicular pode ser avaliado visualmente, através de janelas de acrílico, e quimicamente mediante micro-eletrodos instalados em cada compartimento. Testes conduzidos com canola evidenciaram significativo efeito da rizosfera sobre características como pH, N<sub>total</sub>, carbono orgânico, condutividade elétrica e compostos orgânicos de baixo peso molecular.

### 3. Grupos bacterianos

Segundo Tate III (1995), o número de bactérias que habitam a rizosfera gira em torno de 10<sup>9</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, e nesta fração de solo podem ser encontrados de 10 a 1000 vezes mais microrganismos do que no solo não rizosférico (VANCURA e KUNC, 1989).

A distribuição de microrganismos ao longo da raiz na rizosfera é potencialmente uma característica microbiana muito importante. A quimiotaxia pode ser uma resposta aos substratos vindo das raízes, ou mesmo de gradientes de dióxido de carbono,

modificando o crescimento microbiano que se inicia ao redor das raízes, existindo uma grande probabilidade de que o substrato possa selecionar estes organismos. Os experimentos com solos esterilizados diferem dos com solo natural devido ao fenômeno da competição. Além disso, no ambiente rizosférico ocorre uma modificação no gradiente de concentração de nutrientes em função destas interações (BOWEN e ROVIRA, 1999).

Para as rizobactérias influenciarem a fisiologia do crescimento das plantas, elas precisam primeiramente colonizar a superfície da raiz (JAMES et al, 1985). O crescimento de bactérias Gram negativas é estimulado por fatores seletivos. Assim, o grupo de organismos que inclui as *Pseudomonas* spp, foi encontrado em forma de microcolônias recobrando aproximadamente de 4-10% da superfície da raiz, mostrando uma forte interação com a planta (TATE III, 1995).

O grupo dos actinomicetos geralmente obtém sua energia a partir da decomposição dos componentes da matéria orgânica do solo, cuja decomposição é mais lenta (TATE III, 1995).

Os estudos de Kloepper et al. (1992) mostraram que os gêneros dominantes na rizosfera do amendoim foram as *Flavobacterium* sp. nas vagens, *Pseudomonas* sp. nas raízes e *Bacillus* sp. no solo livre de raízes. Os resultados dos estudos de isolamento bacteriano mostraram que um grupo específico de bactérias está preferencialmente adaptado a colonizar um determinado nicho ecológico.

Segundo Jjemba e Alexander (1999), a habilidade de colonizar as raízes está relacionada ao mecanismo de aderência das bactérias à raiz e à capacidade de usar o exsudato da raiz para crescimento rápido, nas concentrações dos componentes excretados pelas raízes, garantindo assim sua sobrevivência em grande número no solo e determinando seu sucesso na colonização da rizosfera.

#### 4. Exsudato

O exsudato, produto das células radiculares, é composto de aminoácidos, alifáticos e aromáticos, amido, açúcares e amino açúcares, complementados por uma gama de substâncias solúveis e insolúveis, além de esfoliações das raízes e secreções

de mucigel. Estas substâncias podem atrair ou repelir os microrganismos como biostáticos, biocidas, compostos de secreção de raízes, extrusão e células descamadas. Sendo a capa da raiz a zona de maior exsudação de material mucilaginoso de natureza polissacarídica, é a responsável por 80% do carbono total emitido pela raiz (PAUL e CLARK, 1989).

A composição do exsudato de raiz varia em função da espécie, da idade e das condições fisiológicas da planta, bem como de inúmeros fatores abióticos. Este exsudato serve de fonte energética e nutriente para os microrganismos, aumentando seu número e atividade, porém este efeito pode ser negativo diante de microrganismos indesejáveis (CAMPBELL e GREAVES, 1990). Sua composição é um parâmetro primário de seleção de atividade a espécies na comunidade rizosférica e na diversidade na comunidade. A evolução de uma rizosfera ativa está ligada a uma variedade de impactos, com efeitos direto e indireto na produção de biomassa da planta. A dinâmica da população microbiana na rizosfera é benéfica, e até mesmo essencial, para uma ótima produtividade da planta. A estimulação microbiana pelo exsudato da raiz pode resultar diretamente na síntese de hormônios vegetais pelos microrganismos que estimulam a produção do exsudato, impedindo desse modo sua acumulação. Este estímulo pode aumentar com a difusão externa dos componentes do exsudato da raiz (TATE III, 1995).

Embora ainda permaneça questionável, a exsudação radicular, gradativamente, deixa de ser considerada como uma via indesejável de perda de carbono, passando a ser encarada como um processo benéfico, atuando como um recurso complementar na zona radicular, favorecendo de certa forma a biossíntese exógena de vários hormônios vegetais de crescimento por microrganismos rizosféricos (MARTINEZ-TOLEDO et al., 1988). A exsudação radicular pode conter inúmeros precursores específicos para a comunidade rizomicrobiana permitindo a biossíntese da maioria dos reguladores de crescimento requeridos pelas plantas que, ao crescerem em condições ambientais desfavoráveis, passam a depender desta produção exógena (ARSHAD E FRANKERBERGER JR., 1998)

Entre os vários fitohormônios, a cinetina (uma citoquinina) foi comprovada como indutora do crescimento de pêlos radiculares em plântula de alfafa (*Medicago sativa* L.),



além de favorecer os mecanismos de percepção e transporte iônico através da membrana plasmática de células da raiz (SILVERMAN et al., 1998). Este incremento de pêlos radiculares aumenta a área da superfície de contato da ordem de 300 %, conforme observado na cultura de trigo e cevada (GAHOONIA et al., 1997) e tem um reflexo direto sobre a eficiência na absorção de nutrientes, especialmente para aqueles com menor mobilidade no solo, como observado para o  $P^{32}$ , que foi absorvido diretamente do solo por meio dos pêlos radiculares do centeio (GAHOONIA E NIELSEN, 1998).

A exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, principalmente os ácidos di e tricarboxílicos, têm sido considerado como potentes agentes de dissociação de sais de P, Fe e Mn, e podem representar o principal mecanismo de controle da fome de nutrientes em plantas (STROM, 1997). Este mecanismo tem sido melhorado em plantas de *Lupinus albus* L. que, sob deficiência severa de P, desenvolve uma raiz especial chamada de proteóides, adaptadas a fixar o  $CO_2$  difuso no solo, como mecanismo complementar para aumentar a exsudação desses ácidos na rizosfera e assim vencer a deficiência do P.

Vancura e Kunc (1989) evidenciaram a influência do exsudato na mineralização e imobilização de nutrientes de planta na rizosfera, bem como a influência sobre os produtos de transformação de constituintes orgânicos do solo.

## 5. Fósforo

O fósforo é o nutriente que mais limita a produtividade de culturas na maioria dos solos não adubados e algumas plantas modificam o pH da rizosfera para melhor aproveitar o fósforo. Os teores de fósforo solúvel no solo são baixos, da ordem de 0,1 mg de P/L de solo, o que decorre da baixa solubilidade dos compostos e da alta capacidade de adsorção pelas partículas de solo. Com a ação do tempo e da temperatura o fósforo adsorvido passa da forma lábil para a não-lábil, havendo uma queda da eficiência relativa do fósforo aplicado (VAN RAIJ, 1991).

As plantas respondem à limitação de fósforo estendendo as raízes secundárias, de modo a alcançar sítios mais distantes em busca do elemento (WILLIAMSON et al.,

2001), ou exsudando ácidos orgânicos (RYAN et al., 2001). Os microrganismos podem contribuir disponibilizando fósforo para as plantas por meio de transformações metabólicas ou de interações com a raiz, influenciando na sua arquitetura (RICHARDSON, 2001).

Embora os fertilizantes sejam usados extensivamente na agricultura, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar seus efeitos sobre os microrganismos, no sentido de manejar a microbiota da rizosfera para aumentar o crescimento da planta através do uso dos microrganismos (BOWEN e ROVIRA, 1999).

A solubilização dos fosfatos pode ocorrer por dois mecanismos: pelo enzimático e pela produção de ácidos orgânicos. Barea et al. (1970) mostraram que o isolamento bacteriano era baseado no mecanismo enzimático, selecionando bactérias com potencial solubilizador, mas não considerando a solubilização pelo mecanismo indireto, por meio da produção de ácidos orgânicos que também pode ser muito importante na nutrição vegetal.

## 6. Guandu

As leguminosas são plantas que apresentam a melhor taxa de rizodeposição, contendo espécies selvagens adaptadas para colonizar e sobreviver em solos deficientes em alguns nutrientes (WHIPPS, 1990).

O guandu (*Cajanus cajan*) é uma destas espécies, e pode ser encontrada no Brasil central. Produz grãos para consumo humano e animal; serve como forrageira nas fazendas, por ser rica em proteína, e como adubo verde, por melhorar o solo. É uma leguminosa de origem africana, pouco exigente, que prefere solos drenados com pH entre 5 e 8, e produz até 14 toneladas de matéria seca ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, em condições ideais. O guandu pode ser encontrado, algumas vezes, associado às bactérias formadoras de nódulo e capazes de fixar nitrogênio (SEIFFERT e THIAGO, 1983).

Esta cultura cresce bem em solos com baixos níveis de fósforo. Atinge a maturidade entre 80 a 250 dias, porém esse tempo pode ser bastante afetado pela temperatura e pelo fotoperíodo (PHATAK et al., 1993). É altamente tolerante à

desidratação e mostra um aumento na atividade durante o estresse (KELLER e LUDLOW, 1993).

O fósforo é um dos nutrientes limitantes na produção de leguminosas em regiões tropicais e subtropicais. A ação do exsudato radicular do guandu sobre o fósforo ligado ao ferro, em especial a liberação do ácido piscídico, possui ação quelante sobre o ferro (AE et al., 1990). O guandu possui a habilidade de obter fósforo ligado ao ferro e ao alumínio (OTANI e AE, 1996). Ae et al.(1993) relataram que o exsudato, coletado de guandu cultivado em areia, foi separado em 3 frações: fração aniônica, duas vezes mais hábil em solubilizar  $FePO_4$  que a fração catiônica, enquanto que a fração neutra é inativa. A análise da fração ácida mostrou a presença do ácido piscídico, peculiar ao guandu e responsável pela solubilização do fósforo, particularmente em solos com alto teor de ferro.

## **Objetivos**

### Objetivo Geral

Determinar as interações dos grupos de bactérias da rizosfera de guandu submetidos a diferentes regimes de fósforo.

### Objetivo Específico

Enumerar e isolar grupos bacterianos existentes na rizosfera de guandu usando meios de cultura seletivos;

Observar a influência do fósforo sobre os grupos bacterianos da rizosfera de guandu;

Verificar a interação das bactérias, por meio de teste de aglutinação, com o exsudato radicular purificado ou não em coluna de sephadex.

## Referências

AE, N.; ARIHARA, J; OKADA, K.; JOHANSEN, C. Special mechanism of phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. **Research Highlight's 90**, Tropical Agriculture Research Center (TARC), v.90, p.7-9, 1990.

AE, N.; ARIHARA, J; OKADA, K.; YOSHIHARA, T.; OTANI, T.; JOHANSEN, C. The role of piscidic acid secreted by pigeonpea roots grown in na alfisol with low P fertility. In: Eds. Randall, P.J., Delhaize, E., Richards, R.A., Munns, R. **Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition**, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1993, p.279-288.

AIKEN, R.M.; SMUCKER, A.J.M. Root system regulation of whole plant growth. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.34, p.325-346, 1996.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR, W.T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Adv. Agron.**, v.62, p.45-151, 1998.

BAREA, J. M.; RAMOS, A. ; CALLAO, V. Contribucion al estudio "in vitro" de la mineralizacion bacteriana de fosfatos. **Microbiol. Espan.**, v.23, p.257-270, 1970.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Adv. in Agron.**, v.66, p.1-102, 1999.

CAMPBELL, R.; GREAVES, M.P. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: ed. LYNCH,J.M. **The Rhizosphere**. New York : Willey , 1990, p.11-34.

CHENG, W.; ZHANG, Q.; COLEMAN, C.; CARROLL, C.R. ; HOFFMAN, C.A. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? **Soil Biol. Biochem.**, v.28,n.10/11, p.1283-1288, 1996.

CURL, E. A. ; TRUELOVE, B. **The Rhizosphere**. Berlin/ Heidelberg/ New York/ Tokyo : Springer-Verlag, 1986, p.288.

GAHOONIA, T.S.; CANE, D.; NIELSEN, N.E. Roots hairs and phosphorus acquisition of heat and barley cultivars. **Plant and Soil**, v.191, p.181-188, 1997.

GAHOONIA, T.S.; NIELSEN, N.E. direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (<sup>32</sup>P) uptake from soil. **Plant and Soil**, v.198, p.147-152, 1998.

HARTEL, P.G.; BILLINGSLEY, J. W.; WILLIAMSON, J. W. Styrofoam cup-membrane assembly for studying microorganism-root interactions. , **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, n.5, p.1291-1294, 1989.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A.; WEN, F.; WOO, H. H.; ZHU, Y. Function of root border cells in plant health:pioneers in the rhizosphere. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.36, p.311-327, 1998.

HELAL, H.M.; SAUERBECK, D.R. Method to study turnover processes in soil layers of different proximity to roots. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, n.2, p.223-225, 1983.

JAMES JR, D.W.; SUSLOW, T.V.; STEINBACK, K.E. Relationship between rapid, firm adhesion and long term colonization of roots bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, p.392-397, 1985.

JJEMBA, P.K.; ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biol. Biochem.**, v.31, p.623-632, 1999.

KELLER, F.; LUDLOW, M. M. Carbohydrate-metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Experimental Botany**, v.44, n.265, p.1351-1359, 1993.

KLEIN, D.A. The rhizosphere. In: ed. LEDENBERG, J., **Encyclopedia of Microbiology**. 2<sup>a</sup> ed. v.4, New York : Academic Press, 2000, p.117-126.

KLOEPPER, J.W.; MCINROY, J.A.; BOWEN, K.L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, v.139, p.85-90, 1992.

LYNCH, J.M. Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Ed. LYNCH, J.M. **The Rhizosphere**., Chichester : Wiley-Interscience Publication, 1990, p:1-10.

MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; DE LA RUBIA, T.; MORENO, J.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Root exudate of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. **Plant and Soil**, v.110, p.149-152, 1988.

NEWMAN, E.J. Roots microorganisms: their significance in the soil microbial biomass. **Biol. Rev.**, v.53, p.511-554, 1978.

OTANI, T.; AE, N. Phosphorus (P) uptake mechanisms of crops grown in soil with low P status 1. Screening of crops for efficient P uptake. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.42, n.1, p.155-163, 1996.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. New York, Academic Press, 1989. 273p.

PHATAK, S. C.; NADIMPALLI, R. G.; TIWARI, S. C.; BHARDWAJ, H. L. Pigeonpeas : potential new crop for the Southeastern United States. In: JANICK, J.;SIMON, J.E. (eds) **New Crops**., New York ; Wiley, 1993, p.597-599.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.28, p.897-906, 2001.

ROVIRA, A. D. Biology of soil-root interface. In: \_\_\_\_\_ **The soil-root interface**. New York: Academic Press, p.145-160, 1979.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v.52, p.527-560, 2001.

SEIFFERT, N.F.; THIAGO, L.R.L.S. Guandu planta forrageira para a produção de proteína. Comunicado Técnico-**EMBRAPA** Cot. nº 21, novembro, 1983.  
(<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT21.html>)

SILVERMAN, F.P.; ASSIAMAHA, A.A.; BUSCH, D.S. Membrane transport and cytokinin action in root hairs at *Medicago sativa* L.. **Planta**, v.205, p.23-31, 1998.

STRÖM, L. Root exudation of organic acids; importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. **Oikos**, v.80, p.459-466, 1997.

TATE III, R.L. The Rhizosphere/Mycorrhizosphere. In: \_\_\_\_\_ **Soil Microbiology**. New York : Jonh Wiley & Sons, 1995, p.171-185.

VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Piracicaba, Ceres, Potafos, 1991, p.15-17, 181-203.

VANCURA, V.; KUNC, E. **Interrelations between micro-organisms and plants in soil**. Developments in soil Science 18. Amsterdam : Elsevier, 1989, p.492.

WENZEL, W.W.; WIESHAMMER, G.; FITZ, W.J.; PUSCHENREITER, M. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. **Plant and Soil**, v.237, p.37-45, 2001.

WHIPPS, J.M. Carbon Economy. In: LYNCH, J.M. ed., **The Rhizosphere**. Chichester : Wiley-Interscience Publication, 1990, p:59-98.

WILLIAMSON, L.C.; RIBRIOUX, S.P.C.P.; FITTER, A.H.; LEYSER, H.M.O . Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 126, p.875-882, 2001.

YOUSSEF, R.A; CHINO, M. Studies on the behavior of nutrients in the rhizosphere. 1. Establishment of a new rhizobox system to study nutrient status in the rhizosphere. **J. Plant Nutr.**, v.10, p.1185-1195, 1987.

YOUSSEF, R.A; CHINO, M. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.34, n.3, p.461-465, 1988.

ZHU, Y.; PIERSON III, L.S.; HAWS, M.C. Induction of microbial genes for pathogenesis and symbiosis by chemicals from root border cells. **Plant Physiol.**, v.115, p.1691-1698, 1997.



## CAPÍTULO 2- “EFEITO DO FÓSFORO NAS POPULAÇÕES BACTERIANAS DA RIZOSFERA DE GUANDU.”

### Resumo

O objetivo foi verificar em solo rizosférico de guandu, a influência da distância da raiz e de doses crescentes de fosfato sobre bactérias totais, actinomicetos, esporuladas aeróbias, Gram negativas, pseudomonas e solubilizadoras de fosfato. O guandu foi cultivado em células rizosféricas, semelhantes ao rizobox, divididas em compartimentos separados por tela de nylon que dividiram os compartimentos em um central e outros quatro distantes 1 a 5 mm do primeiro. O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Distrófico contendo 3 mg de P  $\text{dm}^{-3}$ . Doses crescentes de fosfato de amônio foram adicionadas ao solo seco (56; 111 e 167mg  $\text{dm}^{-3}$ ) e o solo controle não recebeu P. O número de bactérias aumentou a medida que a concentração de P foi elevada no solo com guandu, enquanto que no solo não cultivado houve uma redução nas contagens com o incremento do P. No rizoplano, o número total de bactérias foi bastante superior em todos os grupos bacterianos. O isolamento de bactérias da rizosfera foi maior conforme aumentou a dose de P adicionada ao solo em relação ao controle sem planta. As contagens para bactérias totais e Gram negativas foram maiores com o aumento da concentração de P, enquanto o grupo das esporuladas mostrou a maior contagem no tratamento sem adição de P, e os actinomicetos na concentração de 56mg de P. Os fatores planta, distância da raiz e doses de fósforo diferiram significativamente entre si para bactérias totais, actinomicetos e Gram negativas. Para as bactérias esporuladas aeróbias apenas o fator doses de fósforo foi significativo. A influência da raiz pôde ser observada nas diferenças das contagens dos diferentes grupos bacterianos, sendo possível verificar tanto interações positivas como negativas.

**Palavras-chave:** *Cajanus cajan*, células rizosféricas, fosfato de amônio, rizoplano, solo

## Introdução

A superfície da raiz é um sítio crítico de interações entre os microrganismos e a planta (PAUL e CLARK, 1989). As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo da rizosfera diferem do solo não rizosférico, e estas diferenças dependem da espécie da planta, do suprimento de nutrientes minerais, das condições nutricionais, das propriedades do solo e da distância da interface raiz-solo. Para evitar o problema de fazer uma separação arbitrária entre solo da rizosfera e o não rizosférico, têm sido adotadas metodologias que viabilizam a separação física dos mesmos (KUCHENBUCH e JUNGK, 1982).

Os nutrientes liberados pelas raízes das plantas apresentam grande variedade de compostos orgânicos. A qualidade e a quantidade das substâncias é constantemente modificada em razão dos tipos de plantas e dos fatores relacionados ao ambiente. Estes fatores podem incluir temperatura, estresse de umidade, adição de fertilizantes, remoção de planta, mudanças de luminosidade, adição de herbicidas, idade da planta e outras mudanças no ambiente da planta (KLEIN, 2000). Obviamente, o aporte de nutrientes ao solo próximo das raízes, bem como as substâncias minerais, produzem importante influência na rizosfera (MERCK et al., 1987).

Na rizosfera, as plantas percebem e respondem às modificações do ambiente, conseqüentemente, durante um crescimento e desenvolvimento normal, uma gama de substâncias orgânicas e inorgânicas é trocada entre a raiz e o solo, o que inevitavelmente leva a mudanças nas propriedades químicas e físicas da rizosfera. As plantas também modificam sua rizosfera em resposta a certos sinais e estresses ambientais. Ânions orgânicos são comumente detectados nessa região, e sua exsudação a partir das raízes de plantas tem sido associada com deficiência de nutrientes e estresse de íons orgânicos. A disponibilidade do P é um dos maiores limitantes do crescimento da planta, em função das quantidades de P solúvel, e a disponibilização do P para as plantas é limitada pelas taxas de reações que repõe o P solúvel (RYAN et al., 2001).

Rovira (1965) relatou que o exsudato da raiz desempenha um papel chave na seleção, atraindo os microrganismos. O sistema radicular das plantas ocupa o horizonte

do solo mais rico em matéria orgânica. As raízes vivas e mortas, e também as sementes, provêm o substrato para o crescimento microbiano. A população bacteriana, bem como a ocupação do ecossistema rizosfera, são influenciados pelo sistema radicular e pelo ambiente do solo, incluindo material mineral e orgânico. Estudos mostraram que as bactérias são estimuladas na rizosfera, e que existe um efeito seletivo para diferentes tipos de bactéria pelas raízes da planta (LOUW e WEBLEY, 1959).

O conhecimento das inter-relações entre os microrganismos e a planta é essencial para explorar as possibilidades de alterar a produtividade pela manipulação das populações microbianas da rizosfera. Para isso têm sido conduzidas análises das relações entre as bactérias específicas do solo e sua planta hospedeira (KLOEPPER et al., 1980). A raiz da planta primariamente determina a natureza e a extensão da microbiota rizosférica saprofítica, e algumas condições que afetam o crescimento da raiz ou seu metabolismo podem refletir na quantidade e na qualidade das mudanças nas populações microbianas da rizosfera (KATZNELSON, 1962). Os microrganismos que respondem ao exsudato da raiz ou ao substrato relacionado predominam na rizosfera. A composição da comunidade de plantas pode influenciar a diversidade da comunidade bacteriana pela variabilidade na composição química do exsudato (KENNEDY, 1999).

Muitos trabalhos citados na literatura referem-se à distribuição de microrganismos inoculados em solo esterilizados (BOWEN e ROVIRA, 1999). Nestas condições os efeitos da competição e do antagonismo são diminuídos, facilitando a migração destes organismos para a raiz.

A população bacteriana, em geral, varia com o distanciamento da raiz. Os grupos mais comuns encontrados na rizosfera são de cocobacilos não esporulados Gram negativos com requerimentos nutricionais simples, seguidos de formas cocóides e de bacilos Gram positivos formadores de esporos (CURL e TRUELOVE, 1986). As pseudomonas fluorescentes são o grupo de microrganismos que melhor representam as populações rizosféricas (CATTELAN et al., 1998), mas estes resultados podem ser uma consequência do uso de meios ricos e das altas temperaturas de incubação, condições sob as quais os heterotróficos de crescimento lento são dominantes

(MILLER, 1990). Os actinomicetos, grupo presente em todas as frações do solo, sofrem a influência direta das plantas, enquanto as bactérias esporuladas aeróbias são representantes típicos do solo não rizosférico (CATTELAN e VIDOR, 1990).

Bowen e Rovira (1999) demonstraram que, em tomate e trevo, a microbiota da rizosfera obteve 85 e 45% mais fósforo, respectivamente, com mais fósforo translocado ao topo da planta que em condições de esterilidade. Nessas condições a população da rizosfera pode ter um grande efeito sobre o processo básico como a obtenção, incorporação e translocação de fósforos. Isto ocorre por rotas metabólicas que influenciam a resistência sistêmica que foi afetada por microrganismos da rizosfera.

Os organismos são, assim, parte importante do solo por realizarem processos de transformações de compostos químicos em nutrientes para as plantas. Alguns microrganismos obtêm energia a partir de metabólitos excretados pelas plantas (VAN RAIJ, 1991). O estudo da população bacteriana é justificado pelos efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas através da ciclagem de nutrientes e da produção de fatores de crescimento. Os solubilizadores de fósforos e fixadores de nitrogênio de vida livre são organismos associados às raízes com capacidade de promover o crescimento das plantas (BOWEN e ROVIRA, 1999).

Um problema muito comum nas regiões tropicais é o da deficiência de fósforo, resultante da rápida fixação dos fertilizantes fosfatados nos solos (NAHAS, 1991). O sistema radicular de algumas espécies de plantas responde localizando regiões com grandes quantidades desse nutriente por meio de modificações, como a proliferação e alongamento das ramificações, para alcançar esses sítios (WILKINSON et al., 2001). Portanto a rizosfera é um ambiente apropriado para estudar o efeito do P, já que é a zona mais próxima das raízes e onde são encontradas transformações que influenciam a disponibilização do fósforo (CHOUDARI e SAXENA, 1974).

Os objetivos deste experimento foram quantificar os grupos de bactérias totais, actinomicetos, esporuladas aeróbias, gram negativas, pseudomonas fluorescentes e solubilizadoras de fósforo em função das distâncias das raízes e das concentrações de P, em solo cultivado com guandu.

## Material e Métodos

### 1. Localização do experimento

O experimento foi conduzido, no período de setembro a novembro de 2000, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal – UNESP. A casa de vegetação construída com canos de PVC de 3/4 de polegada com encaixes de latão curvos e "tee" em PVC para conexões, medindo 150 x160 cm de comprimento, por 1,3m de altura, com uma área interna de 2,4 m<sup>2</sup>. Ela foi dividida em 3 andares de 30 cm cada e a cobertura de 40 cm foi fixada sobre cavaletes ao ar livre, de tal forma que, durante o dia, a cobertura pudesse ser removida.

### 2. Solo

O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Distrófico, que se encontrava em área coberta de mata preservada localizada no município de Jaboticabal-SP. Antes da coleta a camada de vegetação foi removida manualmente, o solo foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm., foi seco em temperatura ambiente e peneirado em malha de 2 mm. O resultado das características químicas do solo encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades químicas do solo de mata do Município de Jaboticabal-SP.

P resina mg dm <sup>-3</sup>	M.O. g dm <sup>-3</sup>	pH(CaCl <sub>2</sub> )	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H+Al	SB	CTC	V
			-----mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						%
03	25	3,8	1,1	2	1	64	4	68	6

P resina = fósforo extraído do solo por resina trocadora de íons; M.O.= matéria orgânica; pH (CaCl<sub>2</sub>) = pH determinado em solução centimolar de cloreto de cálcio; K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>; Mg<sup>+</sup> = potássio, cálcio e magnésio trocáveis; H + Al = acidez potencial; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca de cátions; V = índice de saturação por bases. Análise do solo realizada no Laboratório de Fertilidade do Solo da FCAV-UNESP.

#### 2.1. Tratamento das amostras de solo

##### 2.1.1. Calagem e adubação

Para a correção do solo foi feita a calagem adicionando-se 1,3 g de CaCO<sub>3</sub> dm<sup>-3</sup> de solo e 0,42 g de MgCO<sub>3</sub> dm<sup>-3</sup> de solo, e o solo foi incubado por 21 dias. Posteriormente, foram adicionados ao solo 0,276 g de KNO<sub>3</sub> dm<sup>-3</sup> de solo e 0,234 g de

$\text{NH}_4\text{NO}_3$   $\text{dm}^{-3}$  de solo e a incubação durou 30 dias. A umidade do solo foi ajustada para 50 % da capacidade de retenção de água.

O solo utilizado possuía inicialmente  $3\text{mg dm}^{-3}$  de fósforo. A este solo foram adicionados 56; 111 e 167mg de fósforo na forma de fosfato de amônio por  $\text{dm}^3$  de solo.

### 3. Células rizosféricas (rizobox)

As células rizosféricas foram preparadas como descrito por Youssef e Chino (1988) modificadas por Suzuki (2000)\*. O conjunto constituiu-se de duas placas de acrílico, como paredes externas, e telas de nylon de 25  $\mu\text{m}$  de poro como divisões internas, as quais foram separadas por peças em PVC de 1mm de espessura, formando um quadrado com três lados fechados, e um aberto, o superior, para receber as sementes.

Os compartimentos da célula possuíam duas medidas, de 1 ou 5 mm. Os compartimentos de 5 mm foram os externos, correspondendo ao solo não rizosférico (NR). O compartimento central, onde foram depositadas as sementes, foi denominado rizosfera propriamente dita (R0), e continha o rizoplano (RZP). Os seis compartimentos de 1 mm cada, dispostos três a três para cada lado do compartimento central, foram denominados rizosfera por influência da raiz (R1, R2 e R3).

As sementes de feijão-guandu (*Cajanus cajan*) utilizadas, provenientes da Agropastoril Produtora de Sementes Jaboticabal LTDA-SP, apresentaram 90% de germinação e foram semeadas no compartimento central das células rizosféricas.

O sistema foi irrigado por um período de dois minutos, cinco vezes por dia, através de um conjunto confeccionado com canos de PVC flexíveis, com espessura de 5 mm e orifícios feitos com agulha hipodérmica para gotejamento da água, impulsionado por uma bomba de água de 110 volts.

Realizaram-se três repetições de cada tratamento integralizando 24 células rizosféricas. As células foram enterradas em caixas contendo areia para manter umidade e temperatura constante, onde permaneceram por 32 dias, sendo expostas à luz solar no período do dia e cobertas durante a noite.

#### 4. Cultivo bacteriano

O solo foi retirado de cada compartimento da célula rizosférica e as frações correspondentes de cada tratamento foram homogeneizadas, perfazendo 72 amostras para os tratamentos com planta e 60 amostras para os tratamentos sem planta. Dividiu-se o solo em duas partes: uma para o cultivo bacteriano, conservado a 4 °C por até sete dias e outra seca ao ar, para estoque.

Para o inóculo foram retiradas 10g de solo de cada compartimento, os quais foram diluídos em 95mL de solução de pirofosfato de sódio 0,1 %, e as soluções foram agitadas por 30 minutos em agitador de mesa. O solo correspondente ao rizoplano foi lavado das raízes com 10mL de solução de pirofosfato e seco para pesagem e diluição. A partir da solução inicial fizeram-se diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , cujas alíquotas foram transferidas para meios de cultura seletivos.

Os grupos bacterianos estudados foram: bactérias totais; bactérias Gram negativas; bactérias esporuladas; actinomicetos; pseudomonas e bactérias solubilizadoras de fosfatos. Para o cultivo desses grupos foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar cetramide (Merck) para o gênero *Pseudomonas*, ágar nutriente glicosado para o grupo dos esporulados aeróbios, meio de quitina para os actinomicetos, formulado por Hsu e Lockwood e descrito por Wellington e Toth (1982), meio para os solubilizadores de P (NAHAS et al., 1994), meio Mac Conkey (Meck) para bactérias Gram negativas e CASO ágar (Merck), para bactérias totais. O inóculo das bactérias esporuladas foi aquecido em banho-maria a 80 °C por 10 minutos para destruir as formas vegetativas. (Apêndice)

De todos os compartimentos da célula rizosférica foram transferidos, com auxílio do equipamento "Spiral Plate" (modelo Autoplate 4000-Spiral Biothech), 50µL por placa de Petri, das suspensões de solo nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  para os grupos de pseudomonas, Gram negativas e bactérias totais, e de 100µL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  pelo método de inoculação em superfície para actinomicetos, esporulados aeróbios e solubilizadores de P. As diluições para as amostras do solo do rizoplano foram  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , e para o solo do compartimento central  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . As placas permaneceram em estufa a 30 °C, e a contagem das colônias realizou-se diariamente até estabilizar o

crescimento. Foram feitas 3 repetições das duas diluições, por meio seletivo, por tratamento.

## 5. Análise estatística

O delineamento experimental foi um esquema de parcelas subdivididas em um DIC, sendo nas parcelas o esquema fatorial 2 x 4 (presença / ausência de planta e 4 doses de fósforo) e nas subparcelas as cinco distâncias da raiz, com 3 repetições. Os dados de quantificação bacteriana foram transformados para logaritmo na base 10. Para análise estatística, a distância chamada rizoplano foi retirada por não haver a fração correspondente nos tratamentos sem planta, assim como os grupos de pseudomonas e bactérias solubilizadoras de fosfato, estes por apresentarem um coeficiente de variação muito elevado.

Verificaram-se as causas de variação utilizando o teste F (Tukey), onde os fatores analisados foram a presença de planta, as doses de P e a distância do solo amostrado da raiz da planta, e as análises foram realizadas no SAS (1990).

## Resultados

### 1. Bactérias Totais

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da contagem de bactérias totais considerando-se o efeito das doses de P, da distância da raiz e presença ou ausência de guandu. O número de bactérias totais, para todos os tratamentos, em solo com guandu variou de 7,17 a 184,36 x 10<sup>7</sup> ufc g<sup>-1</sup> solo seco, e no solo sem guandu de 8,51 a 18,05 x 10<sup>7</sup> ufc g<sup>-1</sup> solo seco, o que corresponde a uma variação significativa (p<0,05) de 26 e 2 vezes, respectivamente.



Tabela 2: Efeito do fósforo, da distância da raiz e da presença ou ausência do guandu, sobre o número de bactérias totais ( $\times 10^7$  ufc  $g^{-1}$  solo seco) isoladas de solo das células rizosféricas, em meio seletivo.

Doses de fósforo ( $mg\ dm^{-3}$ )	Distância da raiz	Com guandu	Sem guandu
0	Rizoplano	73,21	-
	R0	15,83	9,62
	R1	11,74	12,10
	R2	8,24	11,77
	R3	8,15	11,39
	NR	7,17	8,66
56	Rizoplano	62,65	-
	R0	16,61	12,69
	R1	17,46	16,64
	R2	14,27	12,23
	R3	9,27	18,05
	NR	10,07	15,86
111	Rizoplano	41,05	-
	R0	37,62	16,05
	R1	24,75	16,48
	R2	11,79	13,52
	R3	12,01	17,23
	NR	13,86	10,98
167	Rizoplano	184,36	-
	R0	21,12	11,88
	R1	17,80	12,63
	R2	15,54	11,39
	R3	19,35	12,80
	NR	12,88	8,51

Causas da variação: planta (A)=0,042\*; doses de P (B)=0,026\*; distância da raiz (C)=0,0004  
 AxB=0,0028\*\*; AxC=0,002\*\*; BxC=0,184; AxBxC=0,403. Diferença significativa da média (DMS  
 5%)=0,181; Coeficiente de variação (CV)=3,721 %.

\* diferença significativa em nível de 5 %; \*\* diferença significativa em nível de 1 %.

ufc: unidades formadoras de colônia; R0: compartimento das raízes; R1:compartimento a 1 mm da raiz ;  
 R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm  
 considerado solo não rizosférico.

Analisando o efeito da distância da raiz, na presença do guandu, verificou-se o maior número de bactérias totais na camada do rizoplano, ou seja, no solo aderido às raízes, em relação às demais frações de solo. As contagens decresceram gradativamente, de 34 para 7 %, para as frações de solo mais afastadas das raízes em relação ao rizoplano (RZP>R0>R1>R2>R3>NR). Na ausência de guandu, nenhuma tendência consistente foi observada entre os números de bactérias totais para as diferentes frações do solo (Tabela 2).

Para efeito das doses de fosfato verificou-se um incremento significativo na contagem de bactérias no solo sob guandu de 27,8 %, 64,7 % e 90,4 % , em relação ao controle (sem P), para as doses de P de 56, 111, 167 mg dm<sup>-3</sup> respectivamente. Na ausência do guandu, constataram-se contagens crescentes de bactérias totais da ordem de 43,0 %, 39,2 % e 7,1 % em relação ao controle, com ao aumento das doses de P respectivamente. Verificou-se também que, nas concentrações crescentes P, ocorreu uma diminuição na contagem bacteriana no tratamento sem planta (Tabela 2).

Embora os resultados apontem para um efeito isolado significativo, não foram constatadas interações significativas entre os fatores doses de P e distâncias da raiz. Para interações entre planta x distâncias da raiz, verificou-se uma pequena variação entre as distâncias da raiz, exceto no rizoplano, porém sem o guandu não foram observadas diferenças entre o número de isolados nos compartimentos (Tabela 2).

Analisando as doses de fósforo em presença do guandu pôde-se observar um padrão no isolamento das bactérias totais, isto é, as doses de fosfato adicionadas produziram um pequeno efeito no incremento de bactérias totais, provavelmente por terem sido escolhidos intervalos pequenos entre uma quantidade e outra; porém o objetivo do trabalho foi o de determinar a menor quantidade de fósforo que influencia o crescimento bacteriano.

## 2 Actinomicetos

Na Tabela 3 observou-se a diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre a contagem de actinomicetos. No solo com guandu as variações obtidas foram de 3,23 a 36,43 x 10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup> solo seco, e no solo sem guandu, foi de 1,12 a 7,64 x 10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup> solo seco.

Tabela 3– Efeito das doses de P, da distância da raiz e da presença ou ausência do guandu sobre o número de actinomicetos ( $\times 10^4$  ufc  $\text{g}^{-1}$  solo seco) isolados de solo das células rizosféricas, em meio seletivo.

Doses de fósforo ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Distância da raiz	Com guandu	Sem guandu
0	Rizoplano	1258,5	-
	R0	14,64	2,28
	R1	8,50	1,97
	R2	4,75	2,24
	R3	4,12	1,36
	NR	8,46	1,72
56	Rizoplano	1747,30	-
	R0	14,65	6,81
	R1	9,20	5,10
	R2	4,05	7,56
	R3	5,87	6,53
	NR	6,91	1,12
111	Rizoplano	1248,1	-
	R0	15,07	4,17
	R1	14,35	3,32
	R2	6,16	5,50
	R3	4,67	3,83
	NR	7,96	5,00
167	Rizoplano	613,25	-
	R0	36,43	3,91
	R1	6,47	4,23
	R2	4,31	5,39
	R3	3,23	7,64
	NR	5,87	4,81

Causas da variação: planta (A)=0,0002\*\*; doses de P (B)=0,00001\*\*; distância da raiz (C)=0,0097\*\*; AxB=0,0087\*\*; AxC=0,0034\*\*; BxC=0,965; AxBxC=0,912. Diferença mínima significativa (DMS 5%)=0,192; Coeficiente de variação (CV)=5,803 %.

\* diferença significativa em nível de 5 %; \*\* diferença significativa em nível de 1 %.

ufc: unidades formadoras de colônia; R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz ; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

No tratamento com guandu o número de actinomicetos aumentou do solo controle para o solo adicionado de 56mg de  $P \cdot dm^{-3}$ , e depois decresceu. Na ausência de guandu, houve um aumento significativo das contagens de actinomicetos em relação às doses de P comparado ao controle (sem P). O aumento da concentração de P no solo parece inibir este grupo bacteriano, como mostram os dados da Tabela 3, onde no isolamento dos actinomicetos a variação da contagem na dose de 56 mg de P foi de 9,5 %, na dose 111 mg de 18 %, e na de 167 mg de 2 % apenas, em relação ao controle sem P. Já no tratamento sem planta o aumento na concentração de P no solo aumentou a contagem de actinomicetos em comparação com a dose zero de P, variando em número de 188 %, 134 % e 194 % respectivamente às concentrações crescentes de P no solo. Verificou-se que o efeito do P é maior sobre o número de actinomicetos isolados do solo sem planta.

O rizoplano foi a fração de solo mais abundante em actinomicetos quando comparado com às demais frações. O decréscimo na contagem foi de 5,94 % (R0) para 0,23 % (NR) em relação ao rizoplano (Tabela 3).

Quando os fatores foram analisados em conjunto não foram detectadas diferenças significativas do efeito planta x doses de P e planta X distância da raiz, em comparação aos fatores isolados, diferente das interações doses de P x distância da raiz e da interação dos três fatores concomitantemente.

### 3. Bactérias esporuladas aeróbias

Pela Tabela 4 observa-se a distribuição das bactérias esporuladas nas diferentes frações do solo sob influência de concentrações crescentes de P. O número de bactérias esporuladas no solo com guandu variou de 6,4 a  $29,8 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> solo seco, e do solo sem guandu de 4,65 a  $29,33 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> solo seco, portanto o fator planta não influenciou significativamente este grupo de bactérias.

Tabela 4– Efeito das doses de P, da distância da raiz e da presença ou ausência do guandu sobre o número de bactérias aeróbias esporuladas(  $\times 10^4$  ufc  $g^{-1}$  solo seco) isoladas de solo das células rizosféricas, em meio seletivo.

Doses de fósforo ( $mg\ dm^{-3}$ )	Distância da raiz	Com guandu	Sem guandu
0	Rizoplano	6590,25	-
	R0	15,54	8,05
	R1	7,02	29,33
	R2	14,26	8,65
	R3	13,27	4,65
	NR	10,96	8,83
56	Rizoplano	5873,76	-
	R0	21,85	5,92
	R1	9,86	10,39
	R2	8,55	7,38
	R3	8,23	12,66
	NR	6,77	8,73
111	Rizoplano	2220,29	-
	R0	20,61	11,10
	R1	29,79	9,79
	R2	15,29	13,73
	R3	8,37	11,49
	NR	10,25	12,66
167	Rizoplano	1341,59	-
	R0	15,25	7,66
	R1	12,88	11,70
	R2	16,21	12,31
	R3	15,78	11,03
	NR	6,38	9,04

Causas da variação: planta (A)=0,813; doses de P (B)=0,029; distância da raiz (C)=0,346;  $A \times B=0,585$ ;  $A \times C=0,017^*$ ;  $B \times C=0,323$ ;  $A \times B \times C=0,054$ . Diferença significativa da média (DMS 5%)=0,211; coeficiente de variação (CV)=6,045 %.

\* diferença significativa em nível de 5 %; \*\* diferença significativa em nível de 1 %.

ufc: unidades formadoras de colônia; R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz ; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

Independente do fator planta, o maior número de isolados foi obtido no tratamento sem adição de P, sendo a diferença de número quase nula entre as doses de P no controle (sem planta). Somente as doses de P influenciaram significativamente na distribuição das bactérias esporuladas, em especial a dose de 111 mg de P  $\text{dm}^{-3}$  que mostrou um efeito pronunciado tanto na presença como na ausência do guandu.

Verificou-se uma redução no número de bactérias isoladas nas concentrações crescentes de P. Na ausência da planta observou-se, uma variação de 13,1 %, 44,1 % e 23,4 % no número de isolados em relação às doses de P 56, 111 e 167 mg em relação ao controle sem P.

Na presença do guandu, o rizoplano foi à fração de solo onde houve a maior contagem de bactérias esporuladas aeróbias. Dentre as distâncias da raiz, a variação da contagem deste grupo de bactérias ficou entre 0,11 % a 1,3 % em relação ao rizoplano. No compartimento R1, sem P e sem planta, foi observada uma média de isolamento 4 vezes maior que no tratamento com planta, fato este que ocorre possivelmente pela resistência deste grupo a condições de privação de elemento essencial. Em relação à distância da raiz observou-se pouca variação entre os compartimentos, exceto no R0 onde foi constatado um aumento no número de bactérias no tratamento com 56 mg de P, o que ocorreu também para concentração de 111 mg de P do compartimento R1, de onde foi isolado o maior número de bactérias.

A interação planta x distância da raiz foi significativa ( $p < 0,05$ ), mostrando que os produtos exsudados pelo guandu foram importantes na manutenção deste grupo na região rizosférica.

#### 4. Bactérias Gram negativas

Na Tabela 5 verificou-se o resultado do isolamento das bactérias Gram negativas em função das dosagens de P e sua distribuição nas diferentes frações do solo da célula rizosférica. O número de Gram negativas na rizosfera do guandu variou entre 43,0 e 1996,9  $\times 10^4$  ufc  $\text{g}^{-1}$  solo seco, em comparação a 2,5 e 10,1  $\times 10^4$  ufc  $\text{g}^{-1}$  solo seco no solo sem guandu. Foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos com e sem planta.

Tabela 5– Efeito das doses de P, da distância da raiz e da presença ou ausência do guandu sobre o número de bactérias de Gram negativas ( $\times 10^4$  ufc  $g^{-1}$  solo seco) isoladas de solo das células rizosféricas, em meio seletivo.

Doses de fósforo ( $mg\ dm^{-3}$ )	Distância da raiz	Com guandu	Sem guandu
0	Rizoplano	4752,92	-
	R0	1212,42	4,61
	R1	189,41	7,63
	R2	150,78	7,66
	R3	175,01	5,78
	NR	43,02	2,55
56	Rizoplano	5639,66	-
	R0	1092,46	6,63
	R1	137,91	10,11
	R2	111,73	5,57
	R3	83,71	6,10
	NR	54,98	4,43
111	Rizoplano	2260,21	-
	R0	1996,93	4,86
	R1	468,20	5,75
	R2	656,19	5,81
	R3	230,55	5,28
	NR	79,03	5,82
167	Rizoplano	9896,01	-
	R0	975,77	5,00
	R1	283,05	8,80
	R2	464,76	6,99
	R3	197,96	8,12
	NR	106,41	2,52

Causas da variação: planta (A)=0,00001\*; doses de P (B)=0,023\*; distância da raiz (C)=0,00002\*; AxB=0,0036\*; AxC=0,00005\*; BxC=0,797; AxBxC=0,958. Diferença significativa da média (DMS 5%)=0,358; coeficiente de variação (CV)=10,68 %.

\* diferença significativa em nível de 5 %; \*\* diferença significativa em nível de 1 %.

ufc: unidades formadoras de colônia; R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz ; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

O efeito do P foi observado por meio do número de isolados em função de quantidades crescentes de P, aumentando a contagem em 98,7 % e 84,5 % nas doses 111 e 167 mg de P, respectivamente, em relação ao tratamento sem adição de P. O solo com maior concentração de P foi o que apresentou o maior número de Gram negativas, e quanto maior a concentração de P menor a variação entre o número de isolados da rizosfera em relação ao rizoplane (1,1 a 9,9 %).

No controle sem planta a variação da porcentagem de isolados foi diminuindo à medida que a quantidade de P aumentava, sendo de 25,7 %, 15,2 % e 10,9% respectivamente, em relação à dose zero de P. Observou-se a mesma tendência das bactérias totais que necessitavam da fonte de carbono oriunda do exsudato radicular.

Na fração do solo aderido às raízes, ou seja, o rizoplane, foi obtido o maior número de isolados em meio seletivo para bactérias Gram negativas. E dentre as distâncias da raiz houve variações de 0,9 a 75,1 % em relação ao controle sem planta. Observou-se uma diminuição marcante no último compartimento de solo em relação às demais distâncias da raiz, provavelmente o alcance do exsudato se tenha estendido até 3 mm do compartimento central. No R0 da dose 111 mg de P foi verificada a menor diferença em relação ao rizoplane, tendo sido isolados números próximos. No tratamento sem guandu não foram observadas muitas diferenças entre os compartimentos do solo.

Na análise de variância somente os fatores doses de P x distância da raiz e os três fatores juntos não mostraram diferença significativa, enquanto as demais e as interações mostraram diferença em nível de 5 %. Por estes dados pode-se inferir que o grupo das Gram negativas é bastante influenciado pelo exsudato radicular.

## 5. Pseudomonas

O meio seletivo contendo cetramide foi utilizado para o isolamento de pseudomonas fluorescentes. A variabilidade dos resultados inviabilizou a análise estatística.



Tabela 6- Efeito das doses de P, da distância da raiz e da presença e ausência do guandu sobre o número de *Pseudomonas* sp. ( $\times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  solo seco) isoladas de solo das células rizosféricas, em meio seletivo.

Doses de fósforo ( $mg.dm^{-3}$ )	Distância da raiz	Com guandu	Sem guandu
0	Rizoplano	0	-
	R0	4,72	0
	R1	6,12	0,80
	R2	1,56	0,79
	R3	0	1,60
	NR	0	0
56	Rizoplano	2169,75	-
	R0	85,26	0,81
	R1	2,98	0
	R2	0,77	0
	R3	0	1,63
	NR	0,73	0,81
111	Rizoplano	0	-
	R0	45,02	1,55
	R1	49,20	5,43
	R2	16,59	5,42
	R3	23,35	6,22
	NR	13,35	2,33
167	Rizoplano	10798,25	-
	R0	206,49	0
	R1	21,38	2,39
	R2	13,76	1,55
	R3	3,06	2,33
	NR	2,30	0

ufc: unidades formadoras de colônia; ss: solo seco; R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

Na Tabela 6 observa-se o efeito do P e das distâncias da raiz no isolamento de pseudomonas em função do efeito do guandu. As maiores contagens foram verificadas no solo com planta (0 a  $206,5 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  solo seco), quando comparadas ao controle sem planta (0 a  $6,22 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  solo seco).

No rizoplano foi onde se isolou o maior número de pseudomonas, apesar de nas doses zero e 111 mg de P não terem sido isoladas bactérias. Com o aumento da concentração de P no solo com guandu observou-se um aumento no número de isolados nas doses 56 e 167 mg de P, e sem planta, na dose de 111 mg de P.

Com o aumento das concentrações de P no solo obteve-se o maior número de isolados de pseudomonas na presença de guandu, e a variação em relação ao número de isolados na dose zero, foram de 435 %, 740 % e 1669 %, na presença do guandu. Na ausência do guandu a variação do número de isolados foi, respectivamente, nas doses de 111 e 167 mg de P, 485 % e 114 %, em relação ao controle (sem P).

Os dados do isolamento de pseudomonas mostram uma preferência por viver na porção mais rica do solo, que é o rizoplano. Sendo este um grupo de bactérias Gram negativas, o comportamento segue a mesma tendência do grupo anterior, onde a quantidade de P parece fundamental quando associada ao exsudato radicular para a proliferação do grupo.

## 6. Bactérias solubilizadoras de fosfatos

Na Tabela 7 encontram-se os dados de contagem de bactérias solubilizadoras de fosfato em porcentagem. Estes dados foram obtidos após repique do cultivo primário de em média 50 colônias por tratamento (dose de P) num total de 438 colônias. No isolamento primário houve confluência de halos de solubilização dificultando a leitura. Como havia muita variação no número de solubilizadoras este grupo foi retirado da estatística.

Tabela 7– Efeito das doses de fósforo, da distância da raiz e da presença ou ausência do guandu sobre o número de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de solo das células rizosféricas em meio seletivo.

Doses de fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )	Distância da raiz	Com guandu (%)	Sem guandu (%)
0	Rizoplano	70	-
	R0	42	67
	R1	38	70
	R2	75	60
	R3	45	60
	NR	43	50
56	Rizoplano	57	-
	R0	32	70
	R1	38	67
	R2	17	80
	R3	25	50
	NR	50	40
111	Rizoplano	44	-
	R0	67	40
	R1	20	50
	R2	40	44
	R3	30	44
	NR	56	33
167	Rizoplano	80	-
	R0	80	22
	R1	60	20
	R2	30	80
	R3	40	78
	NR	40	30

R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz ; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

A maior porcentagem de bactérias solubilizadoras foi observada no rizoplano do tratamento com a maior adição de fósforo; neste mesmo tratamento verificou-se a maior razão entre as médias dos compartimentos R0 com e sem planta. A maior razão entre as médias dos tratamentos com planta e sem planta foi no tratamento com dose de 56 mg de fosfato. Constatou-se, ainda neste tratamento, maior diferença entre as médias com planta e sem planta, e maior razão entre RZP e R2.

Nas doses zero e de 56 mg de P a maior porcentagem de solubilizadoras foi verificada ausência de planta, com media de 61,4 % dos isolados; com 111 mg de P não houve diferença (42 %); e na dose maior de P foi na presença da planta.

Na presença do guandu a maior porcentagem de solubilizadoras concentrou-se nas proximidades das raízes. E sem planta quase não houve diferença. Nas distâncias da raiz a maior porcentagem de solubilizadoras variou nos diferentes compartimentos.

## 7. Distribuição dos grupos dentro das bactérias totais

Na Tabela 8, formada a partir dos dados das tabelas 2 a 6, foram calculadas as porcentagens dos grupos bacterianos em relação às bactérias totais em função das concentrações crescentes de P e das distâncias da raiz.

O grupo dos actinomicetos oscilou entre 3,33 % a 30,41 %, sendo a maior porcentagem verificada na dose 111 mg de P e a menor, na dose 167 mg. As bactérias esporuladas tiveram sua porcentagem máxima e mínima nas doses de 56 e 111mg de P, respectivamente. As bactérias Gram negativas foram as que apresentaram porcentagens maiores dentro a rizosfera, da ordem de 5,46 % a 90,02 %. As pseudomonas, na presença do guandu, mostraram ser minoria em relação aos outros grupos amostrados, representando no máximo 0,59 % das bactérias totais.

Tabela 8- Comparação da porcentagem de actinomicetos, bactérias esporuladas aeróbias, Gram negativas e pseudomonas, em relação ao número de bactérias totais, em presença do guandu.

Dose P mg dm <sup>-3</sup>	Distância da raiz	Actinomicetos	Esporuladas	Gram negativas (%)	Pseudomonas
0	RZP	17,19	90,01	64,92	0
	R0	0,93	0,98	76,60	0,0030
	R1	0,72	0,60	16,14	0,0052
	R2	0,58	1,73	18,29	0,0019
	R3	0,51	1,63	21,49	0
	NR	1,18	1,53	6,00	0
56	RZP	27,89	93,75	90,02	0,3463
	R0	0,88	1,32	65,76	0,0513
	R1	0,53	0,56	7,90	0,0017
	R2	0,28	0,60	7,83	0,0005
	R3	0,63	0,89	9,03	0
	NR	0,69	0,67	5,46	0,0007
111	RZP	30,41	54,09	34,57	0
	R0	0,40	0,55	53,09	0,0120
	R1	0,58	1,20	18,91	0,0199
	R2	0,52	1,30	55,66	0,0141
	R3	0,73	1,39	38,42	0,0194
	NR	0,57	0,74	5,70	0,0096
167	RZP	3,33	72,76	53,68	0,5857
	R0	1,72	0,72	46,19	0,0978
	R1	0,36	0,72	15,90	0,0120
	R2	0,28	1,04	29,90	0,0089
	R3	0,17	0,82	10,23	0,0016
	NR	0,46	0,50	8,26	0,0018

R0: compartimento das raízes; R1: compartimento a 1 mm da raiz ; R2: compartimento a 2 mm da raiz; R3: compartimento a 3 mm da raiz; NR: compartimento de 5 mm considerado solo não rizosférico.

## Discussão

O número de bactérias totais isoladas da rizosfera de guandu, da ordem de  $10^7$  ufc  $g^{-1}$  de solo seco, foi superior ao obtido por Nahas et al. (1994) em latossolos vermelho-escuro, não rizosférico, coletados em Jaboticabal, que variaram de 5,61 a  $142,62 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$  de solo seco. Cattelan e Vidor (1990) também obtiveram número semelhante de bactérias em trabalho avaliando o efeito de sistemas de culturas sobre a população microbiana do solo, e defenderam que os microrganismos podem ser usados como indicadores de condições biológicas do solo, e com isso desempenharam um papel importante na produtividade agrícola.

Miller et al. (1989) também relataram os grupos bacterianos na rizosfera como sendo da ordem de  $10^7$  para as bactérias totais,  $10^5$  para *Bacillus* spp.,  $10^6$  para actinomicetos e  $10^5$  para pseudomonas. Para os autores o número de pseudomonas fluorescentes cresceu com o tempo, em contraste com o grupo de bacilos esporulados que permaneceu relativamente estável. O grupo dos bacilos encontrou-se distribuídos pelo solo enquanto o grupo das pseudomonas encontra-se próximos à raiz.

Entretanto, segundo Tate III (1995), na região da rizosfera geralmente se encontra uma população maior que  $10^9 g^{-1}$ , que pode ser explicada pela estimulação seletiva que promove o crescimento rápido de bactérias Gram negativas e bacilos, tais como: *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes* sp. e *Agrobacterium* sp. Estas bactérias são encontradas na forma de microcolônias cobrindo aproximadamente 4 a 10 % da superfície das raízes.

Os resultados das contagens de bactérias totais sugerem um efeito da planta e do P sobre a comunidade bacteriana. A secreção de exsudatos pelas raízes de guandu propiciou o crescimento de grande número de bactérias totais no rizoplano, que foram diminuindo nas frações de solo mais distantes das raízes, possivelmente em decorrência da diminuição gradativa das quantidades de exsudato.

O rizoplano contém o mucigel que envolve a raiz e serve como fonte de carbono importante para a manutenção das populações microbianas. Sob condições controladas, as células bordo e os produtos associados à raiz podem contribuir com 98% do material rico em carbono, que é liberado pelas raízes e que também funciona

como sinal regulador da produção destas células (HAWES et al., 1998). De acordo com este relato, verificou-se o crescimento das bactérias totais no rizoplano de guandu, enquanto que, sem o sistema radicular o número de bactérias totais diminuiu apesar do aumento da concentração de P.

A medida da rizosfera no experimento de De Neergaard e Magid (2001) foi de 1-3 mm e a influência da rizodeposição no crescimento microbiano estendeu-se acima dos 2 mm além das raízes em solo fértil. O efeito rizosférico foi menos pronunciado no solo pouco fértil, provavelmente pela falta de nutrientes disponíveis para o crescimento microbiano. No presente estudo, foi verificada uma influência do exsudato radicular nas contagens de bactérias, que se estendeu até 5 mm. Constatou-se, também, que a difusão do exsudato radicular pôde ser avaliada através da contagem de bactérias.

A determinação da microbiota do rizoplano poderia ser um parâmetro adicional ao estudo da influência das raízes das plantas sobre os microrganismos de solo. O efeito do gradiente dos produtos difusíveis das raízes diminuiu com o maior distanciamento da raiz, como mostraram Katznelson et al. (1962). Jones (1998) sustentou que as zonas ao redor das raízes estimularam a produção de ácidos, e Sperber e Rovira (1959) observaram que a presença do CO<sub>2</sub>, produzido e liberado pelas raízes e microrganismos, também contribuiu para a acidificação deste local.

Com a elevação da concentração de P, a contagem de bactérias totais isoladas aumentou no solo com guandu. O menor número de bactérias, no solo com guandu e sem guandu, foi verificado na dose zero de P. Na ausência do guandu, foi observada diminuição da contagem à medida que as concentrações de P aumentaram, sugerindo que estas bactérias foram dependentes de uma fonte de carbono e sua diminuição ocorreu pela falta do exsudato, que é composto de substâncias orgânicas. Este resultado foi obtido possivelmente como resposta da planta às condições de privação de nutrientes, que responderam com a modificação na exsudação radicular. Segundo Deguid e Wilkinson (1961), as rizobactérias demonstraram reagir de forma a sobreviver em ambientes onde certos nutrientes, tais com carbono, nitrogênio e fósforo, foram encontrados em quantidades limitantes.

As raízes das plantas criaram um novo ambiente para os microrganismos quando os níveis de nutrientes foram elevados; a população microbiana aumentou, em torno de

1000 a 10000 vezes, e uma mudança marcante na composição das comunidades microbiana pode ocorrer, indicada pela relação rizosfera:solo (CATTELAN et al., 1998).

O número de actinomicetos isolados de solo, com e sem guandu, foi de 1,1 a  $1747,3 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$  da mesma forma Wellington e Thoth (1992) encontraram na ordem de mais de  $10^4 \text{ ufc g}^{-1}$  solo. Cattelan e Vidor (1990) observaram um número de actinomicetos de  $613 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$  solo seco na associação de guandu com milho, como sistema de cultivo.

O guandu influenciou significativamente o crescimento do grupo dos actinomicetos. O efeito da planta está em concordância com a literatura, pois vários trabalhos também relataram esta relação íntima entre o grupo dos actinomicetos e as raízes das plantas como observado por Cattelan et al. (1998).

Quanto ao efeito do P adicionado ao solo, pôde-se constatar que pequenas variações neste fator afetaram de maneira marcante o grupo dos actinomicetos, direta ou indiretamente. As doses de P determinaram a variação das médias de isolamento, independente do fator planta. Porém, com o guandu presente, estas variações não foram observadas entre as doses de P na fração rizosférica do solo, possivelmente porque o P não era o elemento limitante para os actinomicetos, em função, talvez, de seu metabolismo ter sido adaptado a extração de nutrientes, principalmente carbono orgânico.

O efeito inibitório do P sobre as bactérias da rizosfera, poderia ser atribuído a competição dos actinomicetos com outros grupos bacterianos pelas fontes de C, N e P, visto que os actinomicetos são de crescimento lento. Quando uma dose muito pequena de P foi colocada no solo, houve um incremento no número de actinomicetos, provavelmente suficiente para o metabolismo da população em crescimento deste grupo bacteriano e que, posteriormente, se nutre de moléculas complexas provenientes da degradação de material orgânico. Esta hipótese pode ser verdadeira, pois o solo sem planta neste mesmo tratamento apresentou maior número de isolados.

Em relação às distâncias da raiz, no entanto, a variação entre o número de bactérias pode, possivelmente, ser relacionada com a disponibilização, através da exsudação da planta, de moléculas importantes para o metabolismo. Esta diferença



grande no número de actinomicetos mostrou a forte influência do exsudato sobre este grupo de bactérias.

O quando promoveu aumentos nos números de bactérias esporuladas no rizoplano. A atração deste grupo de bactérias para a raiz da planta sugere que este poderia ter habilidade em solubilizar fosfato. Comprovando este resultado, foi verificado um aumento do número de esporuladas na rizosfera nas menores concentrações de P no solo, ao contrario dos dados de Cattelan e Vidor (1990), que dizem ser os esporulados organismos típicos de solo não rizosférico. A presença em maior número deste grupo de bactérias, também no solo sem planta, demonstrou sua habilidade em metabolizar este componente vital com maior eficiência que outros grupos de bactérias.

Observando-se o grupo das bactérias esporuladas aeróbias pode-se dizer que, possivelmente a escassez de P tenha estimulado a formação de esporos, e que o uso de metodologia com aquecimento para eliminar as formas vegetativas, tenha proporcionado condições para a germinação destes esporos em meio de cultura.

Na análise de variância os fatores doses de P e planta x distância da raiz foram significativos em nível de 5%. O grupo das bactérias esporuladas parece ser bastante afetado pela adição de fertilizantes fosfatados, variando conforme a dose administrada. As plantas possuem uma espécie de sinal químico que atrai alguns grupos de microrganismos para junto da região radicular em função da liberação de P para aumentar sua concentração nessa região. A comunidade microbiana que desenvolve no ambiente da rizosfera utiliza os materiais liberados pelas raízes, que não contêm nem N nem P, para o rápido crescimento microbiano. Para atender a estas necessidades os microrganismos usam muitos compostos energéticos provenientes da planta para suprir sua deficiência, e as plantas são levadas a produzir mais energia para os microrganismos que ativam os processos de solubilização de nutrientes (WILLIAMSON et al., 2001).

Cattelan et al. (1998) relataram que o número de bactérias totais e de actinomicetos foram equivalentes em rizosfera de soja nodulada ou não e no solo livre de raízes. Comparando os dois tipos de solos, o gênero *Bacillus* foi o mais comum em ausência das raízes, enquanto o grupo de Gram negativos foi mais representativo na rizosfera. Em um dos solos, foram detectadas diferenças entre a contagem da rizosfera

e do solo sem raízes, mas não para outro solo. Em soja, como em outras culturas, existiu predominância de bactérias Gram negativas na rizosfera. Seus resultados sugerem que as raízes da soja selecionam certas bactérias para sua rizosfera, e que esta seleção muda com o tempo e capacidade de nodulação.

Kloepper et al. (1992) relataram que os gêneros dominantes na rizosfera do amendoim foram *Flavobacterium*, nas vagens, *Pseudomonas*, nas raízes e *Bacillus*, no solo livre de raízes. Os resultados mostraram que um grupo específico de bactérias estava preferencialmente adaptado a colonizar um nicho ecológico, e que o exsudato determinava a localização das bactérias.

No solo com e sem guandu observou-se um isolamento de Gram negativas na ordem de 2,5 a 9896,0 x 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup> solo seco. O isolamento de bactérias das frações do solo, à medida que se afasta da raiz, diminui significativamente. O guandu influenciou o número de isolados à medida que as concentrações de P foram aumentando, sendo que este efeito não pôde ser observado no solo sem planta.

Os resultados do cultivo do guandu mostram uma forte associação dos actinomicetos com a superfície radicular, bem como as esporuladas. Porém as Gram negativas parecem ser o grupo mais hábil em utilizar o exsudato radicular e a sobreviver no gradiente formado pelo mesmo nos primeiros milímetros ao redor das raízes quando comparado aos demais grupos.

Rovira e Brisbane (1967) caracterizaram a rizosfera de trigo e trevo usando técnica de agrupamento por afinidade encontrando bactérias Gram negativas, bacilos pleomórficos e ramificados, de crescimento rápido, sensíveis ao cloranfenicol e resistentes à eritromicina e penicilina. Encontraram pouca ou nenhuma afinidade entre a rizosfera isolada e o tipo de cultura. Rouatt e Katznelson (1962) afirmaram que na rizosfera e no rizoplano a presença das Gram negativas foi maior, diferente do solo livre de raízes onde se encontrou em maior número as Gram positivas.

As Gram negativas são um grupo de bactérias cuja parede celular é rica em fosfolipídeos, motivo pelo qual possivelmente apresentem um metabolismo mais eficiente em utilizar o P (PELCZAR et al., 1996). Lemanceau et al. (1995) indicaram que a razão para seleção bactérias Gram negativas estava na possibilidade de essas bactérias metabolizarem o exsudato das raízes melhor que as Gram positivas.

O grupo das pseudomonas foi encontrado no solo sob guandu variando entre 0 e  $10798,3 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  solo seco, e o rizoplane foi a fração de solo mais abundante em pseudomonas. O afastamento da raiz mostrou efeito determinante na redução deste grupo, enquanto a concentração crescente de P aumentou o número de pseudomonas na rizosfera de guandu. Este grupo mostrou uma variação muito grande no número de isolados, possivelmente pelo uso de meio seletivo.

Sperber e Rovira (1959) revelaram que 60 % das bactérias de trevo e centeio eram pleomórficas, ramificadas e gram variáveis. Pseudomonas fluorescentes foram encontradas por Sands e Rovira (1970), e compreenderam 0,06 e 0,27 % dos isolados do solo e da rizosfera de trigo, respectivamente. Kloepper e Bowen (1991) encontraram  $10^{0,56}$  ufc  $g^{-1}$  de solo rizosférico de pseudomonas e  $10^{3,38}$  ufc  $g^{-1}$  de solo rizosférico de bactérias corineformes em raízes de amendoim. Na rizosfera com guandu os resultados foram bastante variados.

Weger et al. (1994), usando *Pseudomonas putida* construídas para produzir  $\beta$ -galactosidase e responder à restrição de fosfatos, observaram que a técnica era eficiente e poderia ser utilizada para outros nutrientes que não o P, e para indicar as condições de crescimento de alguns nichos ecológicos. O P agiu como promotor de crescimento das pseudomonas, no caso da rizosfera do guandu.

Bar-Yosef et al. (1999) relataram que algumas pseudomonas dissolvem fosfato de rocha em suspensão de ágar e solo, medida pela difusão de produtos dissolvidos. Em tratamento com restrição de P este fato pode ter ocorrido no estudo com guandu.

James et al. (1985) observaram que as pseudomonas estabeleciam rapidamente ligações com as raízes de rabanete, e as pseudomonas promotoras de crescimento de plantas mostraram estar de 40 a 100 vezes mais freqüentes durante o processo de colonização das raízes, quando em solo esterilizado. Os resultados sugerem que alguns tipos de bactérias aderem à superfície das raízes por um pequeno espaço de tempo, porém os experimentos realizados por estes autores foram com solo em condições estéreis, sem competidores, determinando sua habilidade potencial de promover a aderência ou proliferação no rizoplane. No estudo com guandu foi usado solo natural para evitar a perda dos efeitos de interação entre os microrganismos.

O guandu apresentou, no rizoplano, a maior porcentagem de isolados solubilizadores de P. À medida que o solo amostrado foi retirado de distâncias maiores da raiz reduziu a porcentagem de isolados com habilidade de solubilizar este elemento. O aumento das concentrações de P no solo aumentou o número de solubilizadoras isoladas, possivelmente devido ao P adicionado ao solo ter dado um impulso inicial para o estabelecimento deste grupo na rizosfera.

Kucey (1983) afirmou que apenas 1 % do P total do solo encontra-se disponível para as plantas, e em uma fração menor, em solução no solo. Os restantes, excluindo-se ligações orgânicas são formas químicas pouco solúveis. As bactérias e fungos solubilizadores de fosfatos representam 0,5 a 0,1 % do total da população bacteriana e a habilidade de solubilizar P está ligada à produção de ácidos orgânicos. O autor, analisando solos cultivados e virgens, não encontrou relação entre o tipo de vegetação e o número de bactérias solubilizadoras de fosfatos, parecendo não haver relação com os níveis totais ou disponíveis de P.

Nos organismos solubilizadores de fosfato, este sistema é constitutivo e não induzido, por isso o fósforo não tem relação com a presença desses organismos. Os ácidos orgânicos são produzidos como produto final de substratos orgânicos, e podem estar em maior concentração na região da rizosfera. Estas afirmações justificam o aumento de isolados nas maiores concentrações de P no solo sob cultivo de guandu.

Sperber (1958) relatou que os organismos isolados da rizosfera de plantas, especialmente leguminosas, são mais eficientes em solubilizar fosfatos de solo não rizosférico ou de raízes de não leguminosas. E observou que o subcultivo quando executado por muitas vezes, resulta na perda da habilidade das bactérias em dissolver fosfatos, e este achado é mais evidente em isolados do solo que nos isolados de rizosfera. O efeito da solubilização de fosfatos pareceu ser o mecanismo mais importante para a promoção do crescimento da planta em solos férteis e moderadamente férteis, quando o aporte de fósforo foi incrementado com rizóbio ou outro microrganismo solubilizador de fosfato (CHABOT et al., 1996). Neste trabalho observou-se o contrário; na rizosfera foram isoladas mais bactérias solubilizadoras que em solo não rizosférico.

Sperber (1958) isolou organismos capazes de solubilizar apatita de rizosfera e de solo total, sendo encontrados em maior proporção na rizosfera. A zona de solubilização da apatita ao redor da colônia foi confirmada pela produção de ácidos em cultura líquida, porém a queda de pH não foi proporcional e não foram encontradas correlações entre solubilização e pH. Em subcultura, alguns isolados perdem esta habilidade de solubilizar apatita, porém os isolados de solo total perdem mais prontamente esta habilidade que isolados de rizosfera. Estes autores encontraram que 30 a 40 % dos isolados de rizosfera solubilizaram apatita contra 10 a 17 % de isolados do restante do solo. Quando existirem no solo condições em que níveis de carboidratos forem maiores que os produtos finais do metabolismo, os microrganismos podem contribuir para a solubilização de fosfatos. Os exsudatos das raízes são fonte de nutrientes, como os carboidratos, por isto a maior atividade destes organismos ocorre na rizosfera.

Paul e Sundara Rao (1971), cultivando quatro tipos de leguminosas em quatro tipos de solos na Índia, isolaram microrganismos solubilizadores de fosfato da rizosfera. Eles encontraram duas bactérias que solubilizavam uma quantidade maior de fosfatos em pH que variou entre 4,4 a 4,59 em meio líquido, sendo os valores mais baixos do experimento. Outras culturas que solubilizaram fosfato também abaixaram o pH, a solubilização do fosfato mostrou uma correlação inversa com a acidez produzida pelo microrganismo no meio líquido.

Barea et al. (1970), em estudo sobre mineralização bacteriana de fosfatos *in vitro* consideraram que a fração orgânica do fósforo é maior quantitativamente na maior parte dos solos cultiváveis. E sabendo-se que o fósforo não é facilmente utilizável pela ação dos vegetais, a participação dos microrganismos na reação que converte o P orgânico em P assimilável torna-se fundamental para o aproveitamento agrícola destes substratos fosfatados. Alguns estudos, porém atribuem esta ação fosfatásica às raízes das plantas.

Maior crescimento e produção de planta estão associados à presença de bactérias rizosféricas solubilizadoras de fosfato, porém a solubilização não foi detectada. Isto pode ser efeito de promotores de crescimento das plantas produzido por outras bactérias ou ainda por produção de ácidos pelos microrganismos que baixam o pH em níveis em que o fosfato de rocha possa ser solubilizado. Somente estudos com

fósforo marcado poderiam evidenciar se a atividade de solubilização do fosfato era feita pelas bactérias (BOWEN e ROVIRA, 1999).

No trabalho de Miller et al. (1989) a maior porcentagem da população de bactérias totais foi constituída por corineformes e actinomicetos, aproximadamente 10 vezes maior que bacilos e pseudomonas fluorescente. Descobriram que na rizosfera de milho encontraram que os actinomicetos representavam maior porcentagem dentre as bactérias totais. Nesta cultura a quantidade de matéria orgânica gerada pela palha foi de suma importância para o crescimento e manutenção dos actinomicetos. Os autores encontraram diferenças no tipo e composição da população de bactérias da rizosfera de arroz, milho, trigo e pastagem, e também nos grupos de pseudomonas fluorescentes e corineformes, nos cultivos para cada espécie de planta. O grupo *Bacillus* não variou entre os cultivos, ambos os grupos *Bacillus* e pseudomonas fluorescentes representaram o menor número na rizosfera de todos os cultivares quando comparados aos grupos de actinomicetos e corineformes.

Com o guandu os resultados foram diferentes. Na sua rizosfera observou-se que a maior porcentagem de isolados foi de bactérias Gram negativas, o que confirma os dados da literatura, segundo a qual este grupo é típico dessa camada de solo. As bactérias esporuladas mostraram-se representativas no solo rizosférico, bem como os actinomicetos. As pseudomonas, no entanto, foram isoladas em número muito menor que o esperado, representando no máximo 0,5 % das bactérias totais.

Sperber e Rovira (1959) são da opinião de que o grupo das pseudomonas constitui apenas o menor grupo bacteriano da rizosfera; mas a hipótese de Kleeberger et al. (1983), considera as pseudomonas as criaturas mais típicas da rizosfera, provavelmente por presença e não por quantidade. Katznelson et al. (1948), no entanto, relataram que existe considerável ênfase no crescimento de Gram negativas na rizosfera, enquanto outros autores confirmaram que pseudomonas fluorescentes são atualmente o maior grupo de bactérias na rizosfera. Sands e Rovira (1970) não concordam com esta afirmação, pois existem atualmente menos de 10% das colônias no meio não seletivo, enquanto a citação anterior se refere ao desenvolvimento destas bactérias em meio seletivo e sua potencial atividade como agente de controle de

doenças de raízes. No presente trabalho somente uma pequena porcentagem foi de pseudomonas.

## Conclusões

O sistema de células rizosféricas é eficiente como método de separação do solo para estudo de microbiologia da rizosfera.

O guandu atraiu as bactérias Gram negativas, as bactérias esporuladas e os actinomicetos, enquanto as pseudomonas foram pouco freqüente na rizosfera.

O solo não rizosférico teve menor contagem de bactérias que o solo não rizosférico para todos os grupos bacterianos.

As bactérias esporuladas foram o grupo de maior representação no solo livre de raízes, ou seja, sem o guandu.

As bactérias solubilizadoras de fosfato não foram inibidas com o aumento das concentrações de P no solo.

## Referências

BAR-YOSEF, B.; ROGERS, R.D.; WOLFRAM, J.H.; RICHMAN, E. *Pseudomonas cepacia*-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.63, p.1703-1708, 1999.

BAREA, J.M; RAMOS, A.; CALLAO, V. Contribucion al estudio "in vitro" de la mineralizacion bacteriana de fosfatos. **Microbiol. Espan.**, v.23, p.257-270, 1970.

BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Adv. Agron.**, v.66, p.1-102, 1999.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, v.14, p.125-132, 1990.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J.J. Bacterial composition in the rhizosphere of nodulating and non-nodulating soybean. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.62, p.1549-1555, 1998.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarium* biovar. *phaseoli*. **Plant and Soil**, v.184, p.311-321, 1996.

CHOUDARI, J.S.; SAXENA, S.M. Phosphate balance under cowpea and maize plants. **J. Indian Soc. Soil Sci.**, v.22, p.194-197, 1974.

CURL, E.A.; TRUELOVE, B. **The Rhizosphere**. Berlin: Springer-Verlag, 1986, p.288.

DEGUID, J.P.; WILKINSON, J.P. Environmental induced change in bacterial morphology. In: MEYNELL, G.G.; GOODER, H. eds. **Microbial Reaction to Environment**, Eleventh Symposium of the Society for General Microbiology, London: Cambridge University Press, 1961, p.69-99.

DE NEERGAARD, A.; MAGID, J. Influence of the rhizosphere on microbial biomass recently formed organic matter. **European J Soil Sci.**, v.52, p. 377-384, 2001.

HAWES, M.C.; BRIGHAM, L.A.; WEN, F.; WOO, H.H.; ZHU, Y. Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 36:311-327, 1998.

JAMES JR, D.W.; SUSLOW, T.V.; STEINBACK, K.E. Relationship between rapid, firm adhesion and long term colonization of roots bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, p.392-397, 1985.



JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant and Soil**, v.205, p.25-44, 1998.

KATZNELSON, H.; LOCKHEAD, A.G.; TIMONIN, M.I. Soil microorganisms and the rhizosphere. **Bot. Rev.**, v.14, p.543-587, 1948

KATZNELSON, H.; PETERSON, E.A. ; ROUATT, J.W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. **Can. J. Bot.**, v.40, n.9, p.1181-1186, 1962.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agric. Ecos. Environ.**, v.74, p.65-76, 1999.

KLEENBERGER, A.; CASTORPH, A. H.; KLINGMÜLLER, W. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. **Arch. Microbiol.**, v.136, p.306-311, 1983.

KLEIN, D.A. The rhizosphere. In: LEDENBERG, J. ed-in-chief, **Encyclopedia of Microbiology**. 2<sup>a</sup> ed. v.4, New York : Academic Press, 2000, p. 117-126.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TERNEZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.

KLOEPPER, J.W.; McINROY, J.A. ; BOWEN, K.L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, v.139, p.85-90, 1992.

KLOEPPER, J.W.; BOWEN, K.L. Quantification of the geocarposphere and rhizosphere effect of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, v.136, p.103-109, 1991.

KUCEY, R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Can. J. Soil Sci.**, v.63, p. 671-678, 1983.

KUCHENBUCH, R., JUNGK, A. A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin silicing rhizosphere soil. **Plant Soil**, v.68, p.391-394,1982.

LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.;ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soil borne population of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1004-1012, 1995

LOUW, H.A. ; WEBLEY, D.M. The bacteriology of the root region of the oat plant growth under controled pot culture conditions. **J. Appl. Bact.**, v.22, n.2, p.216-226, 1959.

MERCK, R.; DIJKSTRA, A.; DEN HARTOG, A.; VAN VEEN, J.A. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. **Biol. Fertil. Soils**, v.5, p. 126-132, 1987.

MILLER, H. J.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Varation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. **Can. J. Microbiol.**, v.35, n.6, p.656-660, 1989.

MILLER, H.J.; LILJEROTH, E.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. **Can. J. Microbiol.**, v.30, p.254-258, 1990.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo. Transformações microbianas.** Jaboticabal, SP, FUNEP, 1991. 67p.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Rev. Bras. Cienc. Solo**, v.18, p.49-53, 1994.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. New York, Academic, 1989. 273p .

PAUL, N.B.; SUNDARA RAO, W.V.B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. **Plant and Soil**, v.35, p.127-132, 1971.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Volume II, 2ªed. São Paulo : Makron do Brasil, 1996. p.11-35.

ROUATT, J.W.; KATZNELSON, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. **J. Appl. Bacteriol.**, v.24, p.164-171, 1961.

ROVIRA, A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.19, p. 241-266, 1965.

ROVIRA, A.D.; BRISBANE, P.G. Numerical taxonomy and soil bacteria. In: GRAY, T.; PARKINSON, D. (eds). **Ecology of soil bacteria**. Liverpool : University Press, 1967, p.337-350.

ROVIRA, A.D. Plant root exsudates. **Bot. Rev.**, v.35, p.17-34, 1969.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v.52, p.527-560, 2001.

SANDS, D.C.; ROVIRA, A.D. Isolation of fluorescent pseudomonads with a selective medium. **J. Appl. Microbiol.**, v.20, p.513-514, 1970.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system, SAS/STAT user's guide (Version 6)**. 3<sup>o</sup> ed. Cary, N.C.: SAS Institute, 1990, 705p.

SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Aust. J. Agric. Res.**, v.9, p.778 - 781, 1958.

SPERBER, J.I.; ROVIRA, A.D. A study of the bacteria associated with the roots of subterranean clover and Wimmera rye grass. **J. Appl. Bact.**, v.22, p.85-95, 1959.

TATE III, R.L. The Rhizosphere/Mycorrhizosphere. In: **Soil Microbiology**. New York : John Wiley ; Sons, 1995, p.171-185.

VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991, p.15-17, 181-203.

WEGER, L.A.; DEKKERS, L.C.; VAN DER BIJ, A.J.; LUGTENBERG, B.J.J. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, n.1, p. 32-38, 1994.

WELLINGTON, E.M.H.; TOTH, I.K. Actinomycetes In: PAGE, A.L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D.R. (eds). **Methods of soil analysis**. 2.ed. Madison: ASA/SSSA, 1982, p.276.

WILLIAMSON, L.C.; RIBRIOUX, S.P.C.P.; FITTER, A. H.; LEYSER, H.M.O. Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v.126, p. 875-882, 2001.

YOUSSEF, R.A; CHINO, M. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.34, n.3, p.461-465, 1988.

### **CAPÍTULO 3- “INTERAÇÃO DAS BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE GUANDU COM O ESXUDATO DA RAIZ.”**

#### **Resumo**

Bactérias isoladas de solo cultivado com guandu em células rizosféricas, separado por tela de nylon milímetro a milímetro, foram testadas com o exsudato radicular de guandu obtido por cultivadas em solução nutritiva, com e sem fósforo. Os exsudatos utilizados foram o extrato bruto e o purificado de raiz em coluna CM-sephadex C50 e DEAE-sephadex A-50, e o controle foi feito com água destilada esterilizada. Os fatores analisados foram a presença de planta, as doses de fosfato (0, 56, 111 e 167 mg dm<sup>-3</sup> de fosfato), a distância da raiz e as quatro preparações do exsudato radicular. Os fatores analisados isoladamente mostraram diferença significativa, exceto para distância da raiz. A verificação foi que 33,84 % das bactérias isoladas de solo sob guandu aglutinaram. Não se observou influência do P sobre as reações de aglutinação na análise da interação de fatores, porém isoladamente foi significativo ( $p < 0,05$ ), apresentando uma variação de 0,09 a 0,5 % entre as reações de aglutinação. Quando as doses de P foram analisadas em conjunto com a planta, a maior porcentagem de reações positivas de aglutinação foi observada entre as bactérias isoladas do solo com 167 mg de fosfato. Dentre os exsudatos radiculares o que apresentou maior porcentagem de aglutinação positiva foi o purificado, produzido sem P. A interação exsudato de raiz e bactérias da rizosfera de guandu pôde ser verificada através das reações de aglutinação.

**Palavras-chave:** aglutinação; células rizosféricas; fosfato; sephadex; solução nutritiva

## Introdução

Os microrganismos do solo desempenham um papel importante na absorção de nutrientes pelas plantas. Para maximizar os efeitos benéficos da atividade microbiana é preciso conhecer os fatores que influenciam a atividade e a diversidade microbiana (GRAYSTON et al, 1998). Segundo Boureau (1977), as plantas de arroz exsudam açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos através de suas raízes formando um gradiente químico através do qual os organismos podem migrar. O movimento dos organismos associados à raiz ocorre ao longo do gradiente de concentração de nutrientes, a manipulação do exsudato da raiz pode estimular a atração de organismos para a raiz (BOWEN e ROVIRA, 1999). Ademais, na superfície das raízes foram encontradas mucilagens em cuja composição estão presentes compostos pécticos e outros polissacarídeos ácidos (OADES, 1978), os quais podem aglutinar bactérias (ANDERSON E JASALAVICH, 1979).

Van Peer et al. (1990) sugeriram, para as bactérias que habitam a superfície da raiz, que a sua interação com aglutininas da raiz têm importância na fase inicial de aderência de tais microrganismos às células radiculares. Além disso, a aglutinação específica das bactérias tem sido também associada ao fenômeno de aderência às raízes e a colonização da rizosfera (ANDERSON, 1988.) As rizobactérias têm mostrado resultados variados quanto à sua capacidade aglutinante com as aglutininas extraídas de raiz de diferentes plantas, sugerindo que elas estão envolvidas na colonização das raízes e são responsáveis pela especificidade de plantas hospedeiras (CHAO et al., 1988), além de outros fatores celulares envolvidos na interação e colonização planta-bactéria, principalmente as moléculas envolvidas na reação, como sugerido por Del Gallo et al. (1989).

O fósforo é um dos nutrientes limitantes na produção de leguminosas em regiões tropicais e subtropicais e interfere na fisiologia da planta de modo a modificar a composição do exsudato radicular (VAN RAIJ, 1991). A composição e a quantidade variam em relação à condição nutricional da planta, porém o impacto das diferenças sobre os microrganismos da rizosfera não são conhecidos (YANG-CHING e

CROWLEY, 2000). Sabe-se, no entanto, que os processos na rizosfera são fortemente influenciados pela disponibilidade de P (GEELHOED et al., 1999).

Em vista do exposto desenvolveu-se o presente trabalho com objetivo de verificar o efeito das doses de fósforo sobre a exsudação de aglutininas por raízes de guandu e sua interação com as bactérias encontradas na região da rizosfera.

## **Material e Métodos**

1. Solo e guandu: as sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) foram adquiridas na Agro-Pastoril Produtora de Sementes Jaboticabal LTDA e apresentaram uma taxa de germinação de 90 %. As sementes foram cultivadas em um solo da classe Latossolo Vermelho Distrófico, oriundo de mata preservada no Município de Jaboticabal-SP, que foi adicionado com quantidades crescentes de fosfato de amônio (0; 56; 111 e 167 mg dm<sup>-3</sup> de solo seco) e acondicionado em células rizosféricas. As células rizosféricas foram montadas de forma que o solo fosse separado a cada milímetro da raiz, permitindo a difusão de substâncias, sem a presença direta das raízes, entre os compartimentos. As sementes de guandu foram semeadas em número de 10 por célula, diretamente no compartimento central. Após a germinação fêz-se o desbaste para sete mudas por célula. O controle foi constituído de células rizosféricas sem planta, totalizando 8 tratamentos, com planta e sem planta, com 3 repetições cada. O experimento teve a duração de 32 dias.

2. Obtenção das Bactérias: de cada segmento da célula rizosférica, distanciado de zero a 5 mm da raiz, foram retiradas 10g de solo da rizosfera de guandu e do controle. As amostras de solo ainda fresco foram suspensas em 95 mL de água destilada esterilizada, para em seguida ser feita a diluição seriada. Da suspensão bacteriana, na diluição 10<sup>-6</sup>, 50µL foram transferidas para meio de cultura CASO ágar (Merck), distribuído superficialmente e incubado a 30 °C por 72 h. Deste cultivo foram isoladas 50 colônias, ao acaso, por tratamento, e elas foram utilizadas no teste de aglutinação bacteriana com o exsudato radicular.

3. Exsudato de Raiz: as sementes de guandu foram plantadas em bandejas de isopor contendo vermiculita para germinação, e aí permaneceram até atingir 8 a 10 cm de altura, sendo então retiradas, lavadas em água corrente e transferidas para frasco de PVC com capacidade de 34 litros de solução nutritiva (como descrita por Arnon-Hoagland modificado por Subbarao et al. (1997)), para crescimento do guandu. Utilizaram-se dois tipos de solução nutritiva; uma contendo 5 mg/L de fósforo e outra sem a adição de fósforo. Esta solução foi agitada a cada hora e após 15 a 20 dias de cultivo e altura aproximada de 20 a 30 cm, as plantas foram coletadas. As raízes foram lavadas com água destilada esterilizada na proporção de 100 g de raízes para 200 mL de água, agitando-se o frasco manualmente por 15 minutos. O extrato foi filtrado em gaze esterilizada por um período de 10 minutos e centrifugado a  $10.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 20 min. O sobrenadante foi dividido em duas partes, uma delas foi concentrada por liofilização, diluída em 10 mL de água destilada esterilizada e utilizada como extrato bruto e outra parte foi purificada. O processo de purificação iniciou-se com o sobrenadante sendo misturado a CM-Sephadex C-50 na proporção de 3:1 (v:v) sob agitação magnética suave por 15 min. Esta mistura foi filtrada em funil de placa sinterizada, e o filtrado foi misturado ao DEAE-Sephadex A-50 (v:v; 3:1) sob agitação suave por 15 minutos, tendo sido novamente filtrado. Este líquido foi concentrado por liofilização a um volume pequeno, ao qual se adicionaram três volumes de etanol 95 % permanecendo por uma noite a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi coletado após centrifugação e dissolvido em 10mL de água destilada esterilizada a  $4^\circ\text{C}$ , permanecendo por 30 min. nessa temperatura. As substâncias insolúveis foram removidas por centrifugação a  $10.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 15 min., e o sobrenadante foi considerado como exsudato purificado nos testes de aglutinação (CHAO et al., 1988).

4. Teste de Aglutinação: o teste realizado em placa de cultivo celular de 24 poços nas quantidades: 50  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana (preparada em água destilada esterilizada na proporção de  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ , a partir de cultivo em CASO ágar a  $30^\circ\text{C}$  por 15 a 18 h), 150  $\mu\text{L}$  de solução de 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$  e 350  $\mu\text{L}$  de exsudato (ER). Os exsudatos de raiz (ER) utilizados no teste foram: exsudato bruto de raiz cultivado sem fósforo (SPB), exsudato bruto de raiz cultivado com fósforo (CPB), exsudato purificado



de raiz cultivada sem fósforo (SPP) e exsudato bruto de raiz cultivada com fósforo (CPP). Fez-se o controle com água destilada esterilizada no lugar do exsudato. Após leve agitação, a suspensão ficou em repouso por 18 h e o resultado foi lido em microscópio estereoscópico e confirmado em microscópio óptico (CHAO et al., 1988). A aglutinação positiva foi detectada pela presença de grumos enquanto na reação negativa as bactérias permaneceram em suspensão.

5. Análise Estatística: O teste de qui-quadrado não paramétrico foi utilizado para analisar os resultados da aglutinação bacteriana. Os fatores analisados foram a presença de planta, as distâncias da raiz em que a bactéria cresceu, as doses de fósforo adicionadas ao solo no cultivo das plantas, e o tipo de exsudato de raiz (aglutinina) utilizado, foram consideradas seis distâncias da raiz nos tratamentos com planta; e cinco distâncias da raiz nos tratamentos sem planta. Os fatores foram analisados individualmente e associados. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (1990).

## **Resultados e Discussão**

### **1. Análise dos fatores independentes**

A Tabela 1 inclui os valores das porcentagens das reações de aglutinação das bactérias relacionadas ao efeito da presença ou ausência do guandu, as doses de P aplicadas no solo e ao tipo de extrato, bruto ou purificado. A presença do guandu, acarretou um aumento de 12 % nas reações de aglutinação em relação ao tratamento sem planta, e a diferença entre as reações positivas e negativas foi de 13 %, para o mesmo tratamento. Este número demonstra a presença de grupos bacterianos com maior afinidade pela rizosfera do guandu. Isso pode ter ocorrido porque o estabelecimento e a manutenção das populações na rizosfera de plantas jovens dependem do exsudato e secreções da raiz como substrato para nutrição e crescimento (ROVIRA, 1965). Chao et al. (1988) mostraram uma diferença de 52 % para as reações

de aglutinação entre bactérias rizosféricas usando aglutininas de raiz e as bactérias de solo não rizosférico. Estes resultados confirmam os dados deste trabalho, pois onde foi encontrada maior concentração de bactérias na proximidade das raízes evidenciando desta forma a influência do exsudato radicular sobre os grupos bacterianos.

Jasalavich e Anderson (1981), usando extratos aquosos de folhas, raízes e caules de leguminosas purificados por cromatografia de troca iônica, encontraram na sua composição carboidratos e proteínas, de alto peso molecular, que requeriam  $Mg^{2+}$  para ativar a reação e verificaram que, durante a preparação, as aglutininas não absorveram às resinas DEAE Sephadex ou CM Sephadex, embora esse tratamento remova algumas proteínas e carboidratos inativos. Estes autores obtiveram reações com todos os extratos brutos e os testes de aglutinação com preparações brutas e purificadas, mostraram forte e consistente aglutinação com *Pseudomonas saprofitica*. Por meio destes dados os autores demonstraram que as plantas são hábeis em reconhecer diferentemente as células microbianas através da exsudação de aglutininas. No presente estudo, foram verificadas reações com extratos bruto e purificado produzidos em solução nutritiva com ou sem adição de P, e observou-se maior afinidade entre as bactérias isoladas do solo rizosférico com aglutininas purificadas, possivelmente o tratamento de purificação libere sítios de ligação específicos para aglutinação bacteriana.

Anderson et al. (1988) determinaram o quanto o reconhecimento entre bactéria e aglutinina de planta são importantes na colonização. Seus dados sugerem que a aglutinação promove um avanço na ligação temporária, embora para uma ligação secundária, de longa duração, o reconhecimento envolvendo a interação com aglutininas possa ser importante para fixar o nicho inicial, e em seguida, outros processos necessários para colonização poderão ocorrer.

Tabela 1- Efeito da planta, doses de fósforo e tipo de exsudato radicular sobre as reações de aglutinação entre bactérias e aglutininas da raiz de guandu.

	Reação de aglutinação (%)		Total
	Negativo	Positivo	
<b>Planta**</b>			
Sem planta	23,37	21,86	45,23
Com planta	20,93	33,84	54,77
Total%	44,30	55,70	100,00
<b>Doses de P* (mg dm<sup>-3</sup>)</b>			
0	11,64	14,52	26,16
56	13,40	13,50	26,89
111	9,39	13,59	22,98
167	9,88	14,08	23,96
Total%	44,30	55,70	100,00
<b>Exsudato **</b>			
Bruto sem P (SPB)	6,80	13,15	19,95
Bruto com P (CPB)	7,24	12,76	20,00
Purificado sem P (SPP)	5,48	14,52	20,00
Purificado com P (CPP)	6,41	13,59	20,00
Controle	18,39	1,66	20,05
Total %	44,30	55,70	100,00

\*\*Qui-quadrado = 0,001, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 1 %.

\*Qui-quadrado = 0,012, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5 %.

P: fósforo.

James et al. (1985) também demonstraram a necessidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  para promover a aderência de *Pseudomonas fluorescens* isoladas de raízes de plantas, e contataram que a colonização das raízes pode ser promovida pela aderência das bactérias à raiz por um curto período de tempo. Entretanto, a aderência rápida é somente um dos eventos no processo de colonização, que pode atrair um grupo taxonômico na direção ou ao longo das raízes. Já a adesão por longo período pode ser mediada por produção de polissacarídeo extracelular. Van Peer et al. (1990) relataram que a aderência das pseudomonas à superfície das raízes está diretamente relacionada com a sua resposta aglutinativa. A aglutinação das bactérias, com aglutininas da raiz, tornou-se muito importante na fase inicial de aderência da bactéria à célula radicular. No trabalho com guandu observou-se a aglutinação das bactérias isoladas de diferentes frações de solo, nas proximidades das raízes e o maior número de aglutinações não foi verificado na fração mais próxima da raiz, como esperado, possivelmente porque reconhecem a aglutinina para o início do processo de colonização das raízes.

A maior proporção de reações de aglutinação, em relação às doses de fosfato aplicadas ao solo, foi verificada com as bactérias obtidas no tratamento com 0 mg de fosfato e a maior diferença entre reações positivas e negativas, no tratamento com 111mg (Tabela 1). Os resultados demonstram a habilidade dos microrganismos de reagir às condições extremas, como a escassez de alguns nutrientes. No tratamento onde não houve adição de fósforo, o maior número de reações de aglutinação pode ser explicado pela capacidade de responder às condições desfavoráveis. Confirmando estes resultados, Deguid e Wilkinson (1961) observaram modificações morfológicas e fisiológicas em *Klebsiella aerogenes* quando a bactéria cresceu em condições de concentração limitante de nitrogênio e fósforo e as rizobactérias sobreviveram em ambientes onde certos nutrientes são encontrados em quantidades limitantes.

Condições que promovem o crescimento das bactérias na superfície das raízes são também importantes no sucesso da colonização e proliferação de bactéria sobre o sistema radicular (JAMES et al., 1985).

Dentre os ER testados o mais eficiente foi o produzido em solução nutritiva sem fósforo e purificado (SPP), com 14,5 % das reações de aglutinação positiva (Tabela 1). Possivelmente, as aglutininas exsudadas pelas raízes apresentaram componentes

específicos para atração de alguns grupos bacterianos e foram importantes na colonização e manutenção da microbiota rizosférica. Glandorf et al. (1993), estudando o envolvimento das aglutininas da raiz com as pseudomonas da rizosfera, não encontraram diferença significativa entre os isolados nas reações de aglutinação com aglutinina bruta ou parcialmente purificada. Também no estudo de Anderson (1983), apenas algumas poucas bactérias reagiram com o extrato bruto. No presente trabalho, com guandu, o maior número de reações de aglutinação foi visto com o ER purificado. O tratamento de purificação dado ao exsudato mostrou ser mais eficiente quando o ER foi produzido sem P, aumentando em 1,37 % as reações de aglutinação em relação ao ER bruto ( $p < 0.01$ ).

Para o fator distância da raiz (dados não incluídos) não foi encontrada diferença significativa na atividade aglutinante entre as bactérias isoladas das mesmas. Possivelmente a área observada deva sofrer a influência do exsudato radicular de forma constante.

## 2. Análise dos fatores associados

Os dados da Figura 1 mostram que 17 % das bactérias obtidas do solo adicionado de  $167 \text{ mg de P dm}^{-3}$  de solo aglutinaram. Esta foi a maior porcentagem ( $p < 0,01$ ) de reações positivas constatada e foi significativamente maior que a porcentagem de 14 % observada no tratamento com  $56 \text{ mg de P dm}^{-3}$ . Aumentando a concentração de P, houve um aumento nas reações positivas em relação às doses menores. Estes resultados mostram que o fosfato possivelmente modificou a fisiologia radicular favorecendo o crescimento de bactérias com maior afinidade pelo exsudato. A influência da quantidade de um elemento importante como o fósforo, no desenvolvimento vegetal, pode estar relacionada com a modificação na exsudação radicular e essa variação deve afetar a população microbiana, como constatado neste trabalho. Nas concentrações 0 e  $111 \text{ mg dm}^{-3}$  de P, as porcentagens de aglutinações foram as mesmas. As diferenças entre as porcentagens das reações positivas e negativas nas doses de 111 e  $167 \text{ mg de P}$  foram proporcionalmente iguais. Em comparação, na dose de  $56 \text{ mg de P}$  observou-se menor diferença entre a porcentagem

de reações positivas e negativas. Uma quantidade muito pequena de P como esta pode ter estimulado o metabolismo bacteriano de grupos não aglutinantes.

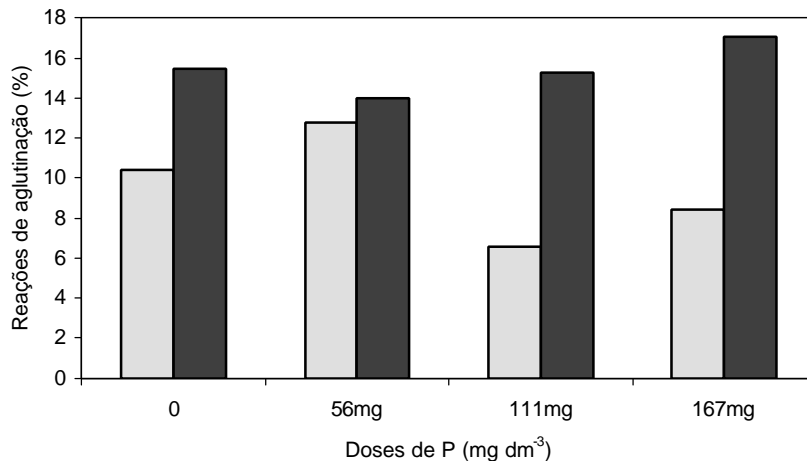


Figura 1-Aglutinação das bactérias isoladas de solo com guarandu com aglutininas do exsudato radicular adicionado de quantidades crescentes de fosfato (Diferença significativa 1 %).

☐ Reações negativas; ☑ Reações positivas.

Na Tabela 2 foi verificou-se o efeito da distância do compartimento central em função das doses de P aplicadas sobre a porcentagem de reações positivas de aglutinação das bactérias na ausência de guarandu. Não foram encontradas diferenças significativas entre as reações de aglutinação entre as doses de P.

Quando as distâncias do compartimento central foram analisadas, observou-se uma variação quanto à localização das bactérias nos compartimentos da célula rizosférica. De modo geral, houve um efeito da distância do compartimento central sobre a porcentagem de aglutinação, sendo que nas concentrações 0 e 56 mg de P, ocorreram as maiores porcentagens de aglutinação para as maiores distâncias do compartimento central, que variaram de 8 a 16 % em função do tipo de exsudato. Nas concentrações de 111 e 167 mg de P, ocorreu o contrário: nas menores distâncias do compartimento central observou-se uma variação de 6 a 18 % de reações positivas. Na ausência do guarandu, esta variação pode ser explicada como uma resposta da ação de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e sombreamento, já que não existiu a influência do fator planta neste ensaio.

Tabela 2- Efeito das distâncias do compartimento central na porcentagem de reações positivas de aglutinação em função do fósforo e exsudato, na ausência do guandu.

Doses de P	Distância do compartimento central (mm)	Aglutinação Positiva (%)					Total
		controle	SBP	CPB	SPP	CPP	
0 mg <sup>NS</sup>	0,01 <sup>*</sup>	0,00	8,89	8,89	11,11	13,33	42,22
	1 <sup>**</sup>	0,00	12,00	12,00	14,00	14,00	57,00
	2 <sup>**</sup>	0,00	8,00	8,00	14,00	14,00	44,00
	3 <sup>**</sup>	0,00	12,00	12,00	16,00	16,00	56,00
	5 <sup>**</sup>	2,00	12,00	12,00	16,00	16,00	58,00
56 mg <sup>NS</sup>	0,01 <sup>NS</sup>	0,00	10,00	8,00	10,00	8,00	36,00
	1 <sup>*</sup>	0,00	12,00	12,00	12,00	12,00	48,00
	2 <sup>*</sup>	0,00	12,00	12,00	12,00	12,00	48,00
	3 <sup>**</sup>	0,00	14,00	16,00	12,00	10,00	52,00
	5 <sup>NS</sup>	6,00	12,00	12,00	12,00	12,00	54,00
111 mg <sup>NS</sup>	0,01 <sup>**</sup>	0,00	15,56	13,33	17,78	13,33	60,00
	1 <sup>NS</sup>	4,00	6,00	12,00	14,00	10,00	46,00
	2 <sup>**</sup>	0,00	15,56	11,11	15,56	11,11	53,33
	3 <sup>NS</sup>	2,22	11,11	8,89	13,33	11,11	46,67
	5 <sup>NS</sup>	0,00	10,00	5,00	10,00	5,00	30,00
167 mg <sup>NS</sup>	0,01 <sup>NS</sup>	0,00	7,50	5,00	7,50	5,00	25,00
	1 <sup>NS</sup>	4,00	14,00	14,00	14,00	14,00	60,00
	2 <sup>NS</sup>	0,00	11,11	13,33	11,11	11,11	46,67
	3 <sup>*</sup>	0,00	12,50	12,50	12,50	12,50	50,00
	5 <sup>NS</sup>	0,00	13,33	13,33	13,33	13,33	53,33

\*\*Qui-quadrado=0,001, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 1 %. \*Qui-quadrado=0,05, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5 %; NS: diferença não significativa. SBP: ER bruto sem fósforo; CPB: ER bruto com fósforo; SPP: ER purificado sem fósforo; CPP: ER purificado com fósforo.

A Tabela 3 revela os resultados da aglutinação bacteriana em presença do guandu e em função da concentração de P e da distância da raiz. Constatou-se o efeito das concentrações crescentes de P sobre a distribuição das reações de aglutinação em função da distância do compartimento. As reações de aglutinação positiva variaram de 9 a 18 %, para uma concentração zero de P, de 8 a 20 % para 56 mg de P, de 12 a 21 % para 111 mg de P e de 9 a 20 % para a maior dose. O número de reações de aglutinação positivas observadas foi maior com as bactérias obtidas do solo com maior adição de fósforo.

Neste estudo observou-se diferença entre a afinidade de certos grupos bacterianos pelo exsudato das raízes de guandu em função das doses de P adicionadas ao solo, demonstrando que a resposta fisiológica da planta ao fator P pode ter influenciado indiretamente o comportamento dos grupos bacterianos, verificado pelas reações de aglutinação. As concentrações deste elemento no solo não foram suficientes para influenciar significativamente as reações de aglutinação. Para Jjemba e Alexander (1999), a competência na colonização, sobrevivência e crescimento dos microrganismos depende da concentração dos constituintes do exsudato radicular no momento de sua secreção, e a habilidade das bactérias de sobreviver em grande número no solo determina seu sucesso na colonização da rizosfera. Reding e Wiegel (1993) mostraram que a quimiotaxia de *Xhantobacter* sp., isolada de raiz de arroz, responde a diferentes fontes de carbono encontradas no exsudato. A resposta dos grupos bacterianos às aglutininas exsudadas da planta em função dos nutrientes do solo é bastante variável, podendo ser influenciada por fatores intrínsecos à planta que modificam a composição do exsudato como resposta aos fatores ambientais.

A distância da raiz foi um fator importante na distribuição das reações de aglutinação, mostrando diferença significativa entre os compartimentos. As bactérias obtidas do solo com 167 mg de P, situadas no compartimento a 3 mm da raiz, reagiram com todos os ER, independente de sua produção ter sido feita com fósforo ou sem fósforo, integralizando a maior porcentagem de reações de aglutinação. Observou-se que nas distâncias de 0 a 5 mm das raízes do guandu ainda existe a influência do ER sobre as bactérias destes segmentos, influência esta devida à atração ou manutenção de organismos na rizosfera.



Tabela 3- Efeito das doses de P, da distância da raiz e do tipo de exsudato sobre a porcentagem de reações positivas de aglutinação das bactérias obtidas da rizosfera do guandu.

Doses P	Distância da raiz (mm)	Aglutinação Positiva (%)					Total
		controle	SPB	CPB	SPP	CPP	
0mg**	0**	2,22	8,89	8,89	11,11	13,33	44,44
	0,01**	1,82	18,18	14,55	16,36	14,55	65,45
	1**	0,00	13,85	13,85	15,38	15,38	58,46
	2**	2,50	17,50	17,50	17,50	17,50	70,00
	3**	2,00	16,00	18,00	12,00	14,00	62,00
	5**	0,00	17,14	17,14	11,43	11,43	57,14
56mg**	0*	3,03	12,12	12,12	13,64	12,12	53,03
	0,01*	2,67	12,00	8,00	13,33	12,00	48,00
	1 <sup>NS</sup>	5,13	7,69	15,38	10,26	12,82	51,28
	2*	0,00	10,91	9,09	12,73	9,09	41,82
	3**	2,50	17,50	15,00	17,50	12,50	65,00
	5**	0,00	20,00	16,00	16,00	16,00	68,00
111mg**	0 <sup>NS</sup>	4,00	12,00	12,00	12,00	12,00	52,00
	0,01**	0,00	19,57	19,57	19,57	19,57	78,26
	1**	2,94	20,59	17,65	20,59	17,65	79,41
	2**	4,35	15,22	15,22	19,57	19,57	73,91
	3**	2,27	13,64	13,64	18,18	18,18	65,91
	5**	2,00	14,00	14,00	18,00	16,00	64,00
167mg**	0 <sup>NS</sup>	2,22	8,89	8,89	13,33	13,33	46,67
	0,01*	6,00	14,00	14,00	18,00	18,00	70,00
	1**	2,00	16,00	16,00	18,00	18,00	70,00
	2**	3,92	13,73	11,76	17,65	15,69	62,75
	3**	0,00	20,41	20,41	20,41	20,41	81,63
	5**	0,00	17,50	17,50	17,50	17,50	70,00

\*\*Qui-quadrado=0,001, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 1 %. \*Qui-quadrado=0,05, diferença significativa entre os tratamentos em nível de 5 %; NS: diferença não significativa. SBP: ER bruto sem fósforo; CPB: ER bruto com fósforo; SPP: ER purificado sem fósforo; CPP: ER purificado com fósforo.

O exsudato radicular produzido sem P e purificado foi o que apresentou a maior média de reações de aglutinação positivas, 13,91, 17,99 e 17,48% para os tratamentos com 56, 111 e 167 mg de P, respectivamente. No tratamento com dose zero de P o exsudato produzido sem P e bruto foi o que mais reagiu com as bactérias isoladas da rizosfera de guandu (15,26 %). O maior número de aglutinações observado com exsudato produzido sem P, possivelmente ocorra devido à modificação no metabolismo da planta para compensar a ausência de P, mudando assim a composição deste exsudato, onde podem estar sendo secretadas maiores quantidades de aglutininas para atrair organismos que venham a compensar esta ausência.

O microambiente criado pelas raízes é de grande importância para a relação planta-microrganismo, principalmente pela exsudação radicular que provê estes organismos de nutrientes necessários para a manutenção e para o crescimento de sua população. A atração de determinados grupos fisiológicos de bactérias para a região das raízes está fortemente influenciada pelo tipo de material exsudado pelas raízes e pelo modo de recepção destas moléculas sinalizadoras pelas bactérias do solo. A distância de alcance destas moléculas está diretamente associada ao tipo de planta utilizado e também ao tipo de solo, pois dependem da dispersão pelo solo para atingir seu alvo que são os microrganismos que irão formar a microbiota das raízes.

Reações de auto-aglutinação (controle) foram observadas variando de zero a 6%, e este é um fenômeno relacionado com a estrutura externa ou estrutura capsular das bactérias (SADASIVAN e NEYRA, 1985) (Tabelas 2 e 3).

## CONCLUSÕES

A difusão do exsudato radicular do guandu mostrou influência sobre as bactérias localizadas até 5 mm distante das raízes.

O exsudato purificado foi mais eficiente que o exsudato bruto quando obtido de guandu cultivado em solução nutritiva sem fósforo.

As bactérias isoladas de solo com menor teor de fósforo apresentaram maior porcentagem de reações de aglutinação quando analisadas isoladamente, porém

quando o fator planta foi incluído, o tratamento com maior teor de fósforo apresentou a maior porcentagem de reações de aglutinação bacteriana.

## Referências

ANDERSON, A.J. ; JASALAVICH, C. Agglutination of pseudomonad cells by plant products. **Physiol. Plant Pathol.** v.15, p.149-159, 1979.

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

ANDERSON, A.J.; HABIBZADEGAH-TARI, P.; TEPPER, C.S. Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. **App. Environ. Microbiol.** v.54, p.375-380, 1988.

BOUREAU, M. Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude de l'exsudation racinaire du riz. **Cahiers OESTROM Serie Biologie**, v.12, p.75-81, 1977.

BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Adv. Agron.**, v.66, p.1-102, 1999.

CHAO, W.L., LI, R-K.; CHANG, W-T. Effect of root agglutinin on microbial activities in the Rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, n.7, p.1838-1841, 1988.

DEGUID, J.P.; WILKINSON, J.P. Environmental induced change in bacterial morphology. In: MEYNELL, G.G.; GOODER, H. (eds), **Microbial Reaction to Environment**, Eleventh Symposium of the Society for General Microbiology, London : Cambridge University Press, 1961, pp.69-99.

DEL GALLO, M.; NEGI, M.; NEYRA, C.A. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.6, p.3504-3510, 1989.

GEELHOED, J.S.; VAN RIEMSDIJK, W.H.; FINDENEGG, G.R. Stimulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. **Europ. J. Soil Sci.**, v.50, n.3, p.379-390, 1999.

GLANDORF, D.C.M.; PETTERS, L.G.L.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P.A. H.; SCHIPPERS, B. Crop specificity of rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, n.8, p.981-989, 1993.

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

JAMES JR, D.W.; SUSLOW, T.V.; STEINBACK, K.E. Relationship between rapid, firm adhesion and long term colonization of roots bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, p.392-397, 1985.

JASALAVICH, C.A.; ANDERSON, A.J. Isolation from legume tissues of an agglutinin of saprophytic pseudomonads. **Can. J. Bot.**, v.59, p.264-271, 1981.

JJEMBA, P.K.; ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biol. Biochem.** V.31, p.623-632, 1999.

OADES, J.M. Mucilages at the root surface. **J. Soil Sci.** v.29, p.1-16, 1978.

ROVIRA, A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Ann. Rev. Microbiol.** v.19, p. 241-266, 1965.

REDING, H.K.; WIEGEL, J. Motility and chemotaxis of *Xantobacter* sp. isolated from roots of rice. **J. Gen. Microbiol.**, v.139, p 815-820, 1993.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C.A. Flocculation of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharids and cyst formation. **Journal of Bacteriology**, v.163, p.716-723, 1985.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system, SAS/STAT use's guide (Version 6)**. 3<sup>o</sup> ed. Cary, N.C.: SAS Institute, 1990, 705p.

SUBBARAO, G.V.; AE, N.; OTANI, T. Genotypic variation in iron-, and aluminum-phosphate solubilizing activity of Pigeonpea root exudates under P deficient conditions. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.3, n.2, p.295-305, 1997.

VAN PEER, R.; PUNTE, H.L.M.; WEGER, L.A.; SCHIPPERS, B. Characterization of root surface and endorhizosphere Pseudomonads in relation to their colonization of roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, n.8, p.2462-2470, 1990.

VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991, p.15-17, 181-203.

YANG-CHING, H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.1, p.345-351, 2000.

YOUSSEF, R.A.; CHINO, M. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.35, p.461-465, 1988.

## APÊNDICE

### FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

#### CASO ÁGAR

Peptona de caseína	17g
Peptona de farinha de soja	3g
D(+)-glucose	2,5g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato de potássio bibásico	2,5g

q.s.p 1000mL água destilada. Autoclavar por 15 minutos à 121°C. pH 7,3.

#### ÁGAR CETRAMIDE

Peptona de gelatina	20g
Cloreto de magnésio	1,4g
Sulfato de potássio	10g
N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	0,3g
Ágar-ágar	13g

Adicionar 10mL de glicerina. q.s.p 1000mL água destilada. Autoclavar 15 minutos à 121°C. pH 7,2.

#### ÁGAR NUTRIENTE GLICOSADO

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Extrato de levedura	1g
Glicose	5g
Ágar	15g

q.s.p 1000mL água destilada. Autoclavar 15 minutos 121°C. pH 7,0.

### ÁGAR PARA SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS

NaCl	0,1g
NH <sub>4</sub> Cl	1g
KCl	0,2g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1g
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2g
Glicose	10g
Extrato de levedura	0,5g
Agar	15g

q.s.p. água destilada 1000mL. pH 7,0. Autoclavar 15 minutos 121°C.

Para cada 100mL de meio adicionar 3mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 10% e 2mL da solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10% e ajustar o pH com NaOH 1N esterilizados.

### ÁGAR MAC CONKEY

Peptona de caseína	17g
Peptona de carne	3g
Cloreto de sódio	5g
Lactose	10g
Mistura de sais biliares	1,5g
Vermelho neutro	0,03g
Cristal violeta	0,001g
Ágar-ágar	13,5g

q.s.p. água destilada 1000mL. Autoclavar 15 minutos à 121°C.

### ÁGAR QUITINA COLOIDAL

Quitina coloidal método extraído de Page et al.(1992).

40g de quitina em 400ml de ácido clorídrico concentrado.

Agitar por 40 minutos.

Após retirar da agitação, adicionar 2 litros de água gelada, para formar um precipitado branco. Coar em filtro de papel com auxílio da bomba de vácuo. Retirar o colóide que ficou retido no filtro e lavar com 5 litros de água destilada e refiltrar. Repetir a lavagem até atingir um pH próximo do da água destilada.

Recolher o colóide e autoclavar por 15 min 121°C. guardar em geladeira. Tirar uma amostra para calcular o peso seco em 105°C.

Quitina coloidal	2g
$K_2HPO_4$	7g
$KH_2PO_4$	0,3g
$MgSO_4 \cdot 5H_2O$	0,5g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01g
$ZnSO_4$	0,001g
$MnCl_2$	0,001g
Ágar	20g

q.s.p. 100mL água destilada. pH 7,0. Autoclavar 15 minutos 121°C.