



# Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental

Editoras  
Adriana Parada Dias da Silveira  
Sueli dos Santos Freitas

Instituto Agronômico  
Campinas (SP), 2007



**Governo do Estado de São Paulo**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Agronômico**

**Governador do Estado de São Paulo**  
José Serra

**Secretário de Agricultura e Abastecimento**  
João de Almeida Sampaio Filho

**Secretário-Adjunto**  
Antônio Júlio Junqueira de Queiroz

**Chefe de Gabinete**  
Antonio Vagner Pereira

**Coordenador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
João Paulo Feijão Teixeira

**Diretor Técnico de Departamento do Instituto Agronômico**  
Orlando Melo de Castro



Governo do Estado de São Paulo  
Secretaria de Agricultura e Abastecimento  
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios  
Instituto Agronômico

# Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental

**Editoras**

Adriana Parada Dias da **SILVEIRA**  
Sueli dos Santos **FREITAS**

Instituto Agronômico  
Campinas (SP), 2007

Ficha elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônomo

M415 Microbiota do solo e qualidade ambiental/editoras Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007.  
312 p.: il.

ISBN: 978-85-85564-14-8

Publicação online

1. Microbiota do Solo 2. Qualidade Ambiental. I. Silveira, Adriana Parada Dias da II. Freitas, Sueli dos Santos III. Campinas. Instituto Agrônomo IV. Título

CDD 631.4

A eventual citação de produtos e marcas comerciais não expressa, necessariamente, recomendações do seu uso pela Instituição.  
É permitida a reprodução, desde que citada a fonte.

#### **Comitê Editorial do Instituto Agrônomo**

Oliveiro Guerreiro Filho

Ricardo Marques Coelho

Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio

#### **Equipe participante desta publicação**

**Coordenação da editoração:** Marilza Ribeiro Alves de Souza

**Revisão de vernáculo:** Maria Angela Manzi da Silva

**Projeto gráfico:** Adriano Reducino

**Editoração eletrônica e criação da capa:** Adriano Reducino

**O conteúdo do texto é de inteira  
responsabilidade dos autores.**

#### **Instituto Agrônomo**

Centro de Comunicação e Transferência do Conhecimento

Caixa Postal 28

13012-970 Campinas (SP) - Brasil

Fone: (19) 3231-5422 (PABX)

Fax: (19) 3231-4943

[www.iac.sp.gov.br](http://www.iac.sp.gov.br)

## Apresentação

Falar da relevância da biota do solo para o ecossistema é redundância. As funções da biota envolvem desde a preservação de água até o seqüestro de substâncias tóxicas, com reflexos para o ambiente, as culturas, os negócios, enfim, para a sociedade. A relação entre a microbiota e a qualidade ambiental é extremamente estreita, com especial atenção para as contaminações de diversas origens, dentre elas as causadas por metais pesados. Utilizar a Microbiologia como ferramenta para avaliar a qualidade de solo é fundamental no caminho da sustentabilidade ambiental agrícola. Há muito, estudos vêm sendo desenvolvidos por renomados pesquisadores de diversas instituições de pesquisa, na reunião de excelências e competências nesse sentido. Esta obra, que se consuma pelo esforço de “discípulos” da Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, que acaba sendo uma justa homenagem dos formados a sua formadora, traz conhecimentos valiosos, que sob a batuta da ilustre professora da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq-USP) certamente trarão grandes contribuições a estudiosos e profissionais da área de solos.

As pesquisadoras do Instituto Agronômico (IAC-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Dra Adriana Parada Dias da Silveira e Dra Sueli dos Santos Freitas, coordenaram e uniram-se a outros especialistas de solos para, com apoio do IAC, transferir informações aos demais elos que compõem a cadeia do agronegócio. Com essa obra, a transferência de tecnologia ganha reforço por disponibilizar na internet conteúdo da maior relevância, na área essencial que envolve os principais tópicos da Microbiologia do solo.

Diante das necessidades de poupar recursos naturais, reduzir custos econômicos e minimizar impactos ambientais, informações que abordem soluções para amenizar as fontes finitas usadas na agricultura são indispensáveis. Que esse e-book seja um estímulo para profissionais de outras áreas de conhecimentos debruçarem-se em torno das demandas do agronegócio não apenas para gerar informações, mas sobretudo para torná-las acessíveis aos que delas precisam para trabalhar.

Pioneiro em pesquisas com solos, o IAC sente-se honrado em participar dessa obra que se destaca pela excelência do conteúdo e por democratizar o saber. No ano em completa seu 120º aniversário, o IAC segue se modernizando, apoiando a chegada da ciência aos usuários e parabenizando a todos que contribuíram para a concretização do e-book “Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental”.

Orlando Melo de Castro  
Diretor-Geral do Instituto Agronômico

## Prefácio

Os microrganismos têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como por sua sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes. Por isso as editoras orgulham-se em trazer a lume este livro, composto por temas dedicados à correlação da microbiota com a qualidade dos sistemas que habita. Em que pese sua importância, ainda há necessidade de textos em língua portuguesa que tornem o assunto acessível a estudantes e profissionais da área.

Dentro dessa proposta - e em consonância com os novos tempos da comunicação - está publicado inteiramente por meio eletrônico, totalmente disponível ao público interessado. Para isso, contamos com o incondicional apoio do Instituto Agrônomo, que nos deu todas as facilidades para que o projeto chegasse a bom termo. Vale lembrar que, neste ano de 2007, o IAC completou 120 anos de fundação: é uma instituição mais que centenária que abraça diariamente a modernidade, com o alvo principal centrado na qualidade agrícola e ambiental!

Talvez não seja do conhecimento dos leitores, mas todos os autores foram orientados da Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, professora titular da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da USP, em Piracicaba, onde leciona desde 1972. Nesse período a Professora Elke criou escola em Microbiologia Agrícola, formando inúmeros profissionais que a ela devem os primeiros passos no mundo da Ciência. É a ela que queremos homenagear dedicando este livro.

Adriana Parada Dias da Silveira (IAC)  
Sueli dos Santos Freitas (IAC)



# Sumário

página

## Parte I

### Aspectos Biotecnológicos

#### Capítulo 1

##### **Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas**

Sueli dos Santos Freitas ..... 1

#### Capítulo 2

##### **A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas**

Faustino Andreola e Silvana Aparecida Pavan Fernandes ..... 21

#### Capítulo 3

##### **Micorrizas Arbusculares em Plantas Tropicais: Café, Mandioca e Cana-de-Açúcar**

Arnaldo Colozzi Filho e Marco Antonio Nogueira ..... 39

#### Capítulo 4

##### **Micorrizas Arbusculares em Plantas Frutíferas Tropicais**

Adriana Parada Dias Da Silveira e Vânia Felipe Freire Gomes ..... 57

#### Capítulo 5

##### **A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas**

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e Marco Antonio Nogueira ..... 79

#### Capítulo 6

##### **Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas**

Valéria Marino Rodrigues Sala, Adriana Parada Dias da Silveira e Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso ..... 97

## **Parte II**

### **Contribuição dos Métodos Moleculares aos Estudos da Microbiota do Solo**

#### **Capítulo 7**

##### **Biologia Molecular do Desenvolvimento de Micorrizas Arbusculares**

Marcio Rodrigues Lambais ..... 117

#### **Capítulo 8**

##### **Emprego de Técnicas Moleculares na Taxonomia e em Estudos Sobre Ecologia e Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares**

Milene Moreira da Silva e Arnaldo Colozzi Filho ..... 127

#### **Capítulo 9**

##### **Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio**

Lucia Vieira Hoffmann ..... 153

#### **Capítulo 10**

##### **Diversidade e Taxonomia de Rizóbio**

Rosana Faria Vieira ..... 165

## **Parte III**

### **Atuação da Microbiota do Solo em Situações de Estresse**

#### **Capítulo 11**

##### **Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo**

Rogério Melloni ..... 193

#### **Capítulo 12**

##### **Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados**

Marco Antonio Nogueira ..... 219

#### **Capítulo 13**

##### **Interações Microbianas e Controle de Fitopatógenos na Rizosfera**

Júlio Alves Cardoso Filho e Marli Teixeira de Almeida Minhoni ..... 239



## **Capítulo 14**

### **Microbiota do Solo como Indicadora da Poluição do Solo e do Ambiente**

Paulo Fortes Neto, Silvana Aparecida Pavan Fernandes  
e Marcelo Cabral Jahnel ..... 259

## **Capítulo 15**

### **Uso de Resíduos na Agricultura e Qualidade Ambiental**

Wanderley José de Melo ..... 275

## **Parte IV**

### **Qualidade Da Água**

## **Capítulo 16**

### **Indicadores Microbiológicos e Padrões de Qualidade da Água**

Suely Martinelli ..... 299

# Capítulo 1

## Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

Sueli dos Santos FREITAS <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) constituem um grupo muito amplo de microrganismos, uma vez que sob essa designação incluem-se quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem beneficemente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais. Convencionalmente, entretanto, não têm sido aí incluídos os rizóbios enquanto fixadores de nitrogênio, atividade que, embora benéfica ao desenvolvimento vegetal, resulta de uma relação simbiótica com as leguminosas, interação que não é considerada para as RPCPs. Já houve sugestões de alteração na denominação dada, de forma genérica, a essas bactérias, alterando-a para BPCP (Bashan & Holguin, 1998), pela substituição do termo “rizobactérias” por “bactérias”. Isso poderia facilitar a nomenclatura, mas nem sempre mudanças são aceitas prontamente pela comunidade científica.

Embora a expressão “plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)” tenha sido proposta por Kloepper & Schroth (1978), o interesse dos pesquisadores ocidentais pelas inúmeras formas de benefício que bactérias podem exercer já havia sido despertado em meados do século XX.

A antiga União Soviética vinha trabalhando com bactérias benéficas nas raízes de plantas havia vários anos. Pelas características do regime político de então, pouco se sabia, além de suas fronteiras, sobre os trabalhos que vinham sendo desenvolvidos. No entanto, um pesquisador inglês, da Estação Experimental de Rothamsted, teve autorização para efetuar visitas a laboratórios e estações experimentais soviéticos, cobrindo vasta área de seu território, e publicou o relato de suas observações na revista *Soils & Fertilizers* (Cooper, 1959). Segundo ele, havia mais de dez milhões de hectares recebendo a inoculação de microrganismos não simbióticos, com alguns resultados verdadeiramente espetaculares.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora, Instituto Agronômico, Centro de Solos e Recursos Ambientais, Caixa Postal – 28, CEP - 13001-970, Campinas, SP. E-mail: [sfreitas@iac.sp.gov.br](mailto:sfreitas@iac.sp.gov.br)

Uma outra pesquisadora da mesma Estação Experimental (Brown, 1974) mencionou aumentos de produtividade de até 42 % em arroz e 10 % em soja, por exemplo. Na época, a grande maioria dos trabalhos científicos em Microbiologia do Solo no Hemisfério Ocidental versava sobre as bactérias incluídas no gênero *Rhizobium*, simbióticas, com habitat e nicho bem definidos. A possibilidade do uso de inoculantes preparados a partir de outras espécies microbianas abria então um grande leque de novas pesquisas e aplicações práticas, num mundo em crescimento e, portanto, ávido por alimentos e por tecnologia, após o término das duas guerras mundiais que tanto afetaram a vida do século XX.

Assim, como tais resultados não poderiam ser ignorados pelo Ocidente, intensificaram-se as tentativas de utilização de bactérias de variados gêneros. No entanto, os poucos trabalhos soviéticos a que se tinha acesso, então, freqüentemente não tinham análises estatísticas, levando-os a algum descrédito por parte dos ocidentais (Burr & Caesar, 1985). Finalmente, no trabalho em que se cunhava a expressão que designaria esse grupo a partir de então, Kloepper & Schroth (1978), apresentaram dados resultantes de experimentação que pôde ser aceita pela comunidade científica internacional. Para chegar a isso, já diversos grupos vinham trabalhando com as agora denominadas RPCPs, como exemplificam os trabalhos de Merriman et al. (1974), Brown (1974, 1972), Kavimandan & Gaur (1971), os quais, evidentemente, tinham também análises estatísticas aos moldes do Ocidente. Na verdade, em 1978, houve uma reunião para juntar as informações disponíveis sobre as interações entre raízes e solos, considerando aspectos químicos, físicos e biológicos, com o objetivo, expresso no título do evento, de estabelecimento de uma rizosfera benéfica (Atkinson & Watson, 2000). Como fruto do pensamento e das linhas de pesquisa vigentes na época, Rovira (1979) identificou como áreas-chave para a continuação dos estudos os trabalhos sobre a liberação de material orgânico a partir das raízes e sobre a colonização radicular por microrganismos; enfatizou, de maneira particular, o conhecimento sobre a fixação biológica do nitrogênio, sobre as micorrizas e sobre as interações de raízes, patógenos e outros microrganismos, potencialmente benéficos.

Numerosos trabalhos foram realizados. Relataram-se benefícios às culturas de milho (Kavimandan & Gaur, 1971; Brandão, 1989), batata (Bakker & Schippers, 1987; Leben et al., 1987), várias gramíneas (Gamo, 1991), alfafa (Olsen & Misaghi, 1981), beterraba (Suslow & Schroth, 1982) e café (Freitas, 1989), entre muitas outras. No Ocidente foram obtidos resultados que poderiam ser também considerados espetaculares: Burr et al. (1978) relataram 100% de aumento na matéria fresca de raízes e parte aérea de batata tratada com *P. fluorescens* e *P. putida* em casa de vegetação; no campo, esses aumentos variaram de 14 a 33%; em alfafa, Olsen & Misaghi (1981) observaram aumentos de 194 % na massa de matéria seca de plantas tratadas com células vivas de *P. fluorescens* e de 167 % nas tratadas com células da mesma espécie bacteriana mortas pelo calor. Em beterraba, obtiveram-se aumentos de 20 a 85% na massa de raízes e da parte aérea; no campo esse aumento era de 13%, tendo-se observado aumentos até mesmo no teor de açúcar (Suslow & Schroth, 1982).

Por vários anos as pesquisas foram promissoras e trabalhava-se com a intenção de apresentar inoculantes que aumentassem a produção agrícola, à semelhança do que já vinha sendo feito há décadas com as bactérias do gênero *Rhizobium*. Mais de

um inoculante foram postos no mercado norte-americano (Weller & Zablotowicz, 1987), principalmente, mas, depois de um desempenho irregular, deixaram de ser vendidos. Começava-se a perceber que os resultados práticos, aplicáveis na agricultura, não surgiriam tão facilmente.

O presente capítulo fará uma retrospectiva resumida do que já foi feito, concretamente, com RPCPs, com ênfase nos benefícios já obtidos, nos insucessos e suas causas e nas perspectivas visualizadas atualmente para essa área da Microbiologia do Solo.

## **2. Promoção do Crescimento Vegetal por Rizobactérias - Um Histórico**

Com a seqüência da experimentação, problemas de instabilidade no comportamento de RPCPs começaram a ser observados, com o mesmo isolado bacteriano comportando-se diferentemente em condições experimentais semelhantes (Howell & Okon, 1987). Um dos mais freqüentes problemas da pesquisa científica na área agrônômica ocorria também entre as RPCPs: bons resultados em experimentos desenvolvidos em casa de vegetação não se repetiam em condições de campo (Leben et al., 1987). Na época, no entanto, ainda se pensava na produção – talvez a curto prazo – de inoculantes comerciais: Paau & McIntyre (1987), no primeiro *workshop* internacional a propósito do assunto, dissertaram sobre a produção e as possibilidades da formulação de inoculantes com RPCPs, estendendo-se sobre a legislação e o direito de propriedade, sempre peculiares quando se trata de microrganismos. Lembraram, inclusive, a necessidade de um trabalho de educação e relações públicas para melhorar a aceitação desses inoculantes: como muitos dos isolados agiam como agentes de controle biológico de fitopatógenos, havia a necessidade de educar os potenciais consumidores para o fato de que a expressão dos resultados de inoculantes microbianos não seria tão pronta quanto a dos produtos químicos destinados ao mesmo fim. Mas fizeram também algumas sugestões sobre a necessidade de se conhecer o modo de ação de cada isolado que seria utilizado como inoculante, já que esse conhecimento poderia aumentar a consistência ou a reprodutibilidade das respostas à inoculação.

Por essa época intensificaram-se as pesquisas sobre o modo de ação das RPCPs. Essa é uma tarefa particularmente extensa, uma vez que, como já foi dito, sob essa denominação agrupa-se um conjunto muito diverso de microrganismos, que, conseqüentemente, exercerão seu benefício – única característica necessariamente comum entre eles – de maneiras também diversas. Alguns modos de ação são aventados pela maioria dos pesquisadores, como a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos, a fixação assimbiótica ou a interferência na fixação simbiótica de nitrogênio e a solubilização de fosfatos.

A produção de fitormônios era a hipótese mais freqüente com que trabalhava o grupo liderado pela Dra. Margareth Brown, da Estação Experimental de Rothamsted, na Inglaterra (Brown, 1974, 1972).

Alguns pesquisadores ainda consideram essa forma de ação uma forte possibilidade para que RPCPs exerçam seu benefício a plantas. Barazani & Friedman (2000), por exemplo, estudaram o efeito de L-triptofano sobre a alongação de plântulas de alface e sobre a atividade aleloquímica de 3 espécies de RPCPs – *Comamonas acidovorans*, *Agrobacterium* sp. e *Alcaligenes piechaudii* –, em condições axênicas, as quais alongaram as raízes das plantas em que foram inoculadas na ordem de 15, 30 e 44% respectivamente, fazendo supor um efeito direto sobre elas, à semelhança de hormônios. No entanto, a presença conjunta do triptofano com *Agrobacterium* e com *Alcaligenes* resultou em raízes menores que as da testemunha sem tratamento, enquanto que conjuntamente com *Comamonas* aumentou a massa de matéria seca de raízes. A hipótese dos autores vai um pouco além do mero efeito direto do hormônio sobre as raízes: como o triptofano inibe a população de *Comamonas*, sugerem que essa bactéria produza ácido indolacético (AIA), que iniba o alongamento da raiz. Na presença de triptofano, a raiz aumenta, pela ausência ou inibição da bactéria. Nesse caso, o triptofano teria tanto um efeito direto no crescimento da raiz quanto um efeito indireto, sobre as rizobactérias. Uma vez que fitormônios podem ser benéficos em concentrações mais baixas mas podem ser prejudiciais em concentrações mais altas (Antoun et al., 1998), seu papel na promoção do crescimento deve ser mais complexo do que normalmente seria esperado. Algumas enzimas, por exemplo, podem atuar modulando a produção de fitormônios, o que regularia, em última análise, a promoção do crescimento por alguns isolados de RPCPs, conforme já foi sugerido para a enzima desaminase do ácido aminociclo propano desaminase (ACC desaminase) por Rodríguez & Fraga (1999).

Ainda quanto à produção de fitormônios, é interessante mencionar que, sob essa perspectiva, testaram-se rizóbios como promotores do crescimento de plantas não leguminosas. Em experimentos utilizando 266 isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, Antoun et al. (1998) concluíram que 58 % das bactérias empregadas nos testes produziam AIA, um hormônio que poderia estar envolvido também em prejuízos às plantas quando em concentrações mais elevadas. De acordo com esses autores, rizóbios exibem uma série de características que os habilitariam como promotores de crescimento como, por exemplo, a produção de sideróforos, a solubilização de fosfatos e até mesmo o antagonismo a fitopatógenos. Fixadores não simbióticos de nitrogênio foram levados em conta por outros autores na definição de formas de promoção do crescimento: Gamo (1981), utilizando *Azospirillum*, e Howell & Okon (1987), com *Azospirillum*, *Azotobacter* e *Rhizobium*, consideraram que a fixação de nitrogênio não era a explicação correta para os benefícios observados com o emprego dessas bactérias, mas sim a produção de fitormônios.

Entre os modos de ação sugeridos para RPCPs talvez o mais lembrado pelos pesquisadores ao longo do tempo tenha sido o controle biológico de fitopatógenos. No entanto, a forma pela qual as bactérias exerceriam esse controle pode variar. A produção de antibióticos foi, inicialmente, a maneira mais aceita, como, por exemplo, no trabalho de Howell & Stipanovic (1980), talvez por ser a ação mais simples e mais direta de um microrganismo sobre outro. Antibióticos como substâncias que inibiriam fitopatógenos e, por conseguinte, promoveriam o crescimento vegetal têm fundamento particularmente quando se dá ênfase a bactérias do gênero *Bacillus*, sabidamente

produtoras de tais compostos (Bettiol, 1995). *Pseudomonas* spp., todavia, também são freqüentemente relatadas como produtoras de antibióticos (Harrison et al., 1993). Há trabalhos comprovando que diferentes isolados de *P. fluorescens* produzem antibióticos inibidores de inúmeros patógenos: Brisbane et al. (1989) relataram a inibição de 17 fungos por um isolado dessa espécie, efeito esse comprovadamente devido ao antibiótico e não ao sideróforo que o isolado também produzia. Ainda o mesmo isolado foi utilizado por Bull et al. (1991) no controle de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, agente causal da doença conhecida como mal-do-pé em trigo. O mesmo patógeno é inibido tanto *in vitro* quanto *in vivo* por uma outra espécie de *Pseudomonas*, *P. aureofasciens*, também produtora de antibiótico (Harrison et al., 1993).

Todavia, outras maneiras de antagonizar fitopatógenos já foram aventadas para RPCPs. A mais viável parece ser a presença de sideróforos, substâncias quelantes do íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) produzidas pelos microrganismos em condições de deficiência desse elemento (Leong, 1986). Nesse caso, os microrganismos produtores de sideróforos teriam vantagem sobre os outros, uma vez que o pouco ferro disponível estaria disponível apenas para eles próprios, que, na qualidade de produtores de sideróforos, teriam também desenvolvido um processo específico, ao nível de isolado, para retirada do nutriente da molécula do quelante e seu transporte pelo interior da célula (Hohnadel & Meyer, 1988). Aliás, esse é um dos motivos pelos quais bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* são tão pesquisadas como promotoras do crescimento: o que lhes confere fluorescência é justamente um sideróforo, denominado genericamente pioverdina e produzido em condições de deficiência de ferro (Stanier et al., 1966; Meyer & Abdallah, 1978).

Há muito tempo já se comprovou que isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* podem promover o crescimento vegetal por privar de ferro potenciais fitopatógenos (Kloepper et al., 1980).

Esse aspecto torna-se ainda mais importante quando se considera a ocorrência dos patógenos menores ou subclínicos, caracterizados por Woltz (1978) como microrganismos que não causam sintomas óbvios de doença, mas deprimem o crescimento da planta como um todo; nesse caso, não há como detectar a presença do patógeno. Quando algum processo, seja qual for, inibir a atuação do patógeno subclínico e a planta apresentar um crescimento maior, a impressão que se terá é a de que houve promoção do crescimento, quando, na verdade, a planta estará apenas exibindo seu potencial de crescimento em condições adequadas de fitossanidade. Nessa linha de pesquisa, Freitas & Pizzinatto (1997) trabalharam com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes e de *Bacillus* spp. Em testes de antagonismo *in vitro*, confrontando em placas de Petri as bactérias potenciais agentes de controle biológico e *Colletotrichum gossypii*, causador de podridões de pré e pós-emergência em algodoeiro, observaram que a maioria dos isolados de *Pseudomonas* foram antagonistas ao fungo no meio B de King et al. (1954) mas não em meio BDA, indicando o envolvimento de sideróforos na inibição, uma vez que o primeiro meio de cultura é deficiente em ferro mas não o segundo. Todos os isolados de *Bacillus* apresentaram antagonismo no meio BDA, indicando, no caso, a produção de antibióticos.

No mesmo trabalho, em outro experimento, avaliou-se a capacidade dos isolados bacterianos, tanto na presença quanto na ausência do patógeno, em promover a emergência e em diminuir a incidência de necrose no colo das plântulas; alguns isolados de *Bacillus* e de *Pseudomonas* promoveram a emergência das plântulas e diminuíram a incidência da doença avaliada pela necrose no colo. Todavia, em experimento em casa de vegetação, os resultados não se repetiram: alguns isolados de *Pseudomonas* – nem sempre os mesmos – favoreceram o desenvolvimento das plantas em relação à testemunha, mas só em ausência do patógeno, indicando que a promoção do crescimento não estava ligada ao controle biológico do fungo inoculado. No entanto, no trabalho feito, não foi possível comprovar se havia patógenos subclínicos envolvidos.

Sideróforos poderiam estar igualmente envolvidos no fornecimento de ferro como nutriente para plantas. O ferro é muito abundante na crosta terrestre mas nem sempre está em forma disponível às plantas: em solos com valor de pH próximo ou acima de 6, encontra-se na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que se precipita e não é absorvida pelos vegetais (Froehlich & Fehr, 1981). As plantas classificam-se como eficientes ou ineficientes em ferro, de acordo com sua resposta à deficiência do nutriente: eficientes são as que se mostram tolerantes à deficiência, isto é, aquelas que possuem mecanismo de resposta a estresse por ferro, enquanto ineficientes são as susceptíveis, que não apresentam resposta a tal estresse (Hopkins et al., 1992). Morris et al. (1990) sugeriram que microrganismos constituiriam um dos fatores de solo a influenciar o aparecimento de clorose por deficiência de ferro, seja por competição com as plantas pelo nutriente seja pela mobilização do ferro lábil no solo. Poderia ter havido uma evolução conjunta entre plantas e microrganismos produtores de sideróforos: a eficiência de algumas espécies ou variedades vegetais estaria ligada, na verdade, a sua capacidade de se associar a microrganismos que lhes disponibilizassem o ferro (Mozafar et al., 1992). O mecanismo pelo qual a planta se apropriaria do ferro ligado aos sideróforos microbianos deve ser bastante complexo (Walter et al., 1994); não obstante, Miller et al. (1985) observaram que tomateiros podem retirar o ferro do complexo Fe-ácido rodotorúlico, um sideróforo produzido pela levedura *Rhodotorula pilimanae*. Parece que espécies eficientes e ineficientes podem ser diferenciadas com base em sua habilidade de usar sideróforos de hidroxamato na absorção de Fe, de acordo com o que foi relatado para plantas de sorgo, ineficientes em ferro, e girassol, eficientes, que tiveram o ferro fornecido juntamente com um sideróforo microbiano – desferrioxamina B (DFOB); o girassol utilizou o ferro diretamente do quelato, enquanto que o sorgo apenas o utilizou como translocador do nutriente (Cline et al., 1984). De qualquer maneira, o efeito sobre a nutrição em ferro somente seria significativo em solos com valor de pH próximos da neutralidade, nos quais o ferro se precipita em sua forma oxidada,  $\text{Fe}^{3+}$ , tornando-se não disponível para plantas. No Brasil, cujos solos, na sua grande maioria, são ácidos, esse efeito só teria importância em áreas muito específicas, mais provavelmente com adição excessiva de calcário do que em condições naturais, conforme já relatado por Tanaka et al. (1989).

A participação dos sideróforos nos processos em que se envolvem *Pseudomonas* spp. fluorescentes continua a ser pesquisada nos dias de hoje, ainda que nem sempre sua atuação esteja bem esclarecida. Já se detectou, por exemplo, que um isolado de

*Pseudomonas* sp. parece ter a capacidade de interagir com os processos iniciais de infecção por *Rhizobium leguminosarum* em raízes de ervilha, prejudicando o estabelecimento da simbiose. Essa inibição ocorre possivelmente por dois mecanismos complementares, um ligado à disponibilidade de ferro e outro à produção de metabólitos extracelulares inibidores (Berggren et al., 2001). Todavia, a maioria dos pesquisadores trabalha ainda hoje com a hipótese de benefício resultante da produção de sideróforos (Cattelan et al., 1999), seja pelo controle biológico de fitopatógenos (Ramamoorthy et al., 2001), seja – mais raramente – pelo efeito na nutrição das plantas (Rengel et al., 1998).

Há ainda inúmeras outras formas pelas quais rizobactérias poderiam beneficiar o crescimento vegetal, algumas com mais visibilidade e mais trabalhos a elas dedicados, outras com menos pesquisadores a lhes investigar as possibilidades. No entanto, a esse respeito, a pergunta mais freqüente ainda é: por que não existem no comércio inoculantes com RPCPs recomendados para agricultores?

### 3. Limitações ao uso de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

Num trabalho muito extenso, Cattelan et al. (1999) testaram diversas formas pelas quais rizobactérias poderiam promover o crescimento de soja, como: produção ou alteração da concentração dos hormônios vegetais AIA, ácido giberélico, citocininas e etileno; fixação assimbiótica de nitrogênio; antagonismo contra microrganismos fitopatogênicos por sideróforos, b-1.3-glucanase, quitinases, antibióticos e cianeto – que tanto pode ser associado a benefícios quanto a prejuízos –; solubilização de fosfatos minerais ou de outros nutrientes e fixação simbiótica do nitrogênio, afetando a nodulação ou a ocupação dos nódulos. Nesse trabalho, os autores utilizaram 116 isolados bacterianos obtidos de solo ou da rizosfera de soja e avaliaram as seguintes formas de possíveis benefícios para a planta: altura da parte aérea, comprimento da raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz, número e matéria seca de nódulos. Embora tenham observado inúmeras atuações dos microrganismos sobre as plantas, com interações de fatores, consideraram seus resultados inconcludentes sob muitos aspectos. Por exemplo: um isolado, incluído como controle negativo, já que sabidamente só inibia o crescimento de *Sclerotium rolfsii* e de *Sclerotinia sclerotiorum*, promoveu o crescimento das plantas sem que pudesse detectar o motivo do benefício. Já outro isolado, de *Pseudomonas putida*, incluído como controle positivo porque havia demonstrado ser benéfico à soja, foi negativo para a maioria dos modos de ação testados, inclusive a produção de sideróforos, razão de ter sido incluído entre os benéficos. No entanto, pela maioria dos resultados obtidos, sugerem que as seguintes características podem estar ligadas e poderia ser útil basear seleção de isolados nelas: desaminase de ACC, produção de sideróforos, produção de b-1.3-glucanase e solubilização de P. Essas características seriam melhores que prototrofia a biotina, produção de AIA, quitinase e cianeto. Não é novidade, entretanto, a falta de correlação entre características observadas ou quantificadas *in vitro* e a presumível conseqüência dessas características em avaliações *in vivo* (Antoun et al., 1998; Freitas & Pizzinatto, 1997).



Um problema relatado com muita freqüência nos artigos com RPCPs é a variabilidade dos resultados. Howell & Okon (1987) relataram grande variabilidade entre experimentos em estudos utilizando isolados de *Azospirillum* e de *Azotobacter* para verificar se tais gêneros bacterianos exerciam benefício pela fixação de nitrogênio ou por outra forma. De qualquer maneira, consideraram que para *Azotobacter* as respostas eram mais consistentes que para *Azospirillum*. Na mesma época, Weller & Zablutowicz (1987) especularam sobre as razões para o desempenho inconsistente de RPCPs, inclusive de isolados de *Pseudomonas fluorescens* e de *B. subtilis* que vinham sendo comercializados nos Estados Unidos como agentes de controle biológico de fitopatógenos do solo. Os autores citam como possível causa dessa inconsistência a colonização radicular variável, por problemas de sobrevivência do inóculo ou por condições desfavoráveis para a bactéria: se a bactéria não puder colonizar a rizosfera não terá como interagir com a planta. Ainda segundo esses autores, outros fatores do ambiente podem contribuir para minimizar a incidência da doença, motivo pelo qual não se poderia observar promoção do crescimento pelo inoculante adicionado. Além disso, outros patógenos poderiam agir, alterando os efeitos do patógeno-alvo e, conseqüentemente, os do agente de controle biológico.

Os relatos sobre variabilidade dos resultados em trabalhos com RPCPs continuaram mesmo no final do século XX, sendo considerada o principal motivo pelo qual ainda não são produzidos inoculantes de RPCPs comercialmente viáveis (Shishido & Chanway, 1998). Antoun et al. (1998) dizem, textualmente: “a variabilidade dos resultados é um dos maiores problemas associados a experimentos de inoculação de RPCPs e é devida, provavelmente, à complexidade das interações envolvidas na rizosfera entre a planta, a bactéria introduzida e o resto da microbiota rizosférica, neutra ou deletéria”.

O que resta por resolver, nos dias atuais, são as causas dessa variabilidade. Um caminho seguido por muitos autores para explicá-la tem sido a colonização das raízes das plantas. Está bem estabelecido que, para interagir com as plantas, quaisquer microrganismos devem, antes de tudo, estabelecer-se em sua rizosfera (Antoun et al., 1998; Davies & Whitbread, 1989; Jjemba & Alexander, 1999). Assim, já foi sugerido que diferenças na colonização radicular pelas RPCPs poderiam explicar o fenômeno da variabilidade dos resultados (Weller & Zablutowicz, 1987). Todavia, a mera colonização radicular por um isolado promotor do crescimento pode não garantir os benefícios à planta: Chanway et al. (2000) não encontraram correlação entre os números de RPCPs associadas às raízes e o aumento de crescimento do abeto vermelho (*Picea* sp.), uma espécie arbórea utilizada em reflorestamentos em regiões de clima temperado. Aliás, na maioria dos experimentos realizados por esses autores, as plantas com os maiores aumentos de biomassa após a inoculação foram as que apresentaram as menores populações de RPCPs rizosféricas. Os autores sugeriram que, dadas as dificuldades de estabelecimento na rizosfera pelos microrganismos inoculados, seria melhor trabalhar com promotores de crescimento que sejam endofíticos, o que lhes garantiria um habitat menos competitivo. Ainda que no trabalho a presença das bactérias no tecido interno das plantas não tenha sido avaliada, os isolados testados possuíam tal capacidade, conforme relatado pelos autores. Estaria aí um outro aspecto do uso de RPCPs, o uso de bactérias endofíticas, característica que evitaria, pelo

menos parcialmente, o efeito da competição com outros microrganismos nesse habitat reconhecidamente colonizado com tanta intensidade (Barka et al., 2000). Outros autores (Sturz & Nowak, 2000) sugeriram também o uso de RPCPs endofíticas mas lembraram as dificuldades da introdução de componentes bacterianos exógenos em uma comunidade microbiana já bem estabelecida e aclimatada. Esse uso, aliás, apenas diminui a importância da colonização radicular: ainda que microrganismos endofíticos não precisem proliferar agressivamente na rizosfera – característica vital para os exofíticos que devam exercer atividade promotora de crescimento -, devem necessariamente atravessar a rizosfera em números suficientes para alcançar uma boa colonização endofítica. Sturz & Nowak (2000) afirmam que, em comunidades maduras, interações positivas entre populações autóctones são geralmente mais bem desenvolvidas que em comunidades recentemente estabelecidas. O estabelecimento de um novo organismo pode ser prejudicado pela dinâmica do ecossistema que ele está tentando invadir, como uma forma de mutualismo defensivo. Para evitar isso, deve-se introduzir o organismo benéfico o mais cedo possível. Já que microrganismos endofíticos em sementes tendem a evoluir para endofíticos em plantas – isto é, tendem a permanecer na plântula originada da semente que colonizavam – uma boa alternativa seria a inoculação dessas RPCPs nas sementes (Sturz & Nowak, 2000). Evidências das interações de rizóbios com plantas não leguminosas foram dadas por Antoun et al. (1998). Esses autores comentam vários trabalhos em que se observou encurvamento de pêlos radiculares em milho, arroz e cevada, inclusive com a formação de estruturas semelhantes a nódulos em raízes das duas últimas espécies vegetais, como resultado da presença de rizóbios em sua rizosfera. Se bactérias participantes de simbioses tão específicas como os rizóbios conseguem interagir com plantas tão diferentes de seus simbioses, por que organismos menos específicos não poderiam ter desenvolvido sistemas de interação com plantas e microrganismos ao longo da evolução (Atkinson & Watson, 2000)?

De qualquer maneira, RPCPs endofíticas ou exofíticas deverão sobreviver na rizosfera para exercer seu benefício. Depois de uma série de experimentos em que avaliaram a capacidade de RPCPs em colonizar a rizosfera de soja, Jjemba & Alexander (1999) concluíram que a habilidade das bactérias em sobreviver em grandes números no solo é um importante fator a determinar seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera. Isto é, há que se considerar também a presença dos outros microrganismos do solo, que, em última análise, são os competidores que uma RPCP introduzida deve sobrepujar para manter-se no solo ou até mesmo para conseguir penetrar na raiz. A densidade máxima da população alcançada na rizosfera depende do tamanho da população inicial no solo (Jjemba & Alexander, 1999).

Não é de surpreender, pois, que os estudos atuais sobre as causas da variabilidade nos resultados com RPCPs tenham convergido para a sua interação com a microbiota nativa. Microrganismos cobrem cerca de 10% da superfície radicular, utilizando exsudatos para seu crescimento (Rengel et al., 1998). Entre esses microrganismos estão RPCPs, patógenos e a grande maioria dos meros comensais - em relação à planta - que utilizam os exsudatos radiculares como fonte de alimento e energia.

## 4. Tendências Atuais e Perspectivas Futuras nas Pesquisas com RPCPs

Na atualidade, paralelamente às buscas de RPCPs eficientes continuam os estudos que visam a definir as causas da variabilidade nos experimentos utilizando essas bactérias. Tem sido consenso que grande parte do motivo seja a interação com a microbiota nativa (Shishido & Chanway, 1998), ainda que a elucidação dessas interações apresente dificuldades compreensíveis.

A avaliação da competitividade rizosférica foi o que norteou o trabalho de Jjemba & Alexander (1999): esses autores procuraram correlacionar diversas características de um grupo de bactérias com a extensão da sua colonização da rizosfera de soja em solo não esterilizado. Avaliaram as taxas de crescimento em meio líquido e em solo rizosférico esterilizado, mas não encontraram correlação entre essas variáveis e a extensão da colonização em rizosfera não esterilizada. No entanto, para a maioria das bactérias testadas, houve correlação entre as suas populações iniciais no solo e a colonização rizosférica, levando os autores a concluir que a habilidade das bactérias em sobreviver em grandes números no solo é um grande fator determinante do seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera. Essa avaliação seria mais útil em definir a habilidade da bactéria em colonizar a rizosfera do que qualquer das outras variáveis analisadas.

Ainda não há metodologia plenamente aceita – e estabelecida – para avaliar seguramente a colonização radicular pelas RPCPs. Um dos motivos dessa dificuldade reside, provavelmente, no fato óbvio de que o grupo bacteriano englobado pela designação rizobactérias promotoras do crescimento de plantas é muito grande. Com o objetivo de definir um método prático para avaliar a colonização radicular por RPCPs - e, assim, agilizar a seleção de isolados eficientes – Sottero et al. (2006) testaram 64 isolados de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*. Trabalhando com plântulas cultivadas em tubos de ensaio, os autores observaram que a presença de névoa em volta do colo indicava a presença das bactérias naquela rizosfera, o que propuseram como um critério para a seleção prévia de isolados bacterianos.

Não há, todavia, muitas informações sobre as interações de populações microbianas na rizosfera, particularmente sobre as RPCPs. Um fator a complicar estudos desse tipo é o fato de que o solo não é um habitat uniforme: pelo contrário, ocorre um grande número de diferentes habitats, em locais muito próximos uns dos outros. Na verdade, uma população microbiana não está homoganeamente distribuída pelo solo, mas existe como subpopulações distintas nos poros do solo, freqüentemente isoladas dos outros membros da população total (Scott et al., 1995).

É difícil precisar todos os fatores que podem interferir com a microbiota nativa do solo, mas entre eles estão fatores abióticos, como a estrutura e textura do solo – em relação ao conteúdo de umidade e de nutrientes -, a aeração e os valores de pH, e bióticos, como a própria microbiota indígena do solo, bactérias de inoculantes adicionados e as plantas (Shishido & Chanway, 1998). É fácil ver que a influência de cada um desses fatores tem inúmeros desdobramentos. Por exemplo, o genótipo da

planta afeta a exsudação radicular, sustentando comunidades microbianas diferentes não só para cada espécie vegetal (Gu & Mazzola, 2001) como para cada variedade dentro de uma mesma espécie (Rengel et al., 1998). Além disso, a mesma espécie vegetal pode estimular comunidades microbianas diversas entre um local e outro, o que leva a respostas diferentes à inoculação de um mesmo isolado promotor de crescimento (Chanway et al., 2000).

No Brasil, Coelho et al. (2007) detectaram que a rizosfera de alface favoreceu o crescimento de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, em comparação com o crescimento de *Bacillus* spp., que não foi beneficiado. Esse favorecimento foi detectado por comparação da rizosfera de alface com a de chicória (*Cicorium endivia*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*) e tiririca (*Cyperus rotundus*). Apenas a rizosfera de alface teve esse efeito de favorecimento. No entanto, a diversidade tanto de *Bacillus* spp. quanto de *Pseudomonas* spp. é influenciada pela rizosfera em que se desenvolvem (Coelho, 2006). A mesma conclusão chegaram Freitas & Aguilar-Vildoso (2004), em trabalho com três espécies cítricas (*Citrus* spp.).

Numa tentativa de caracterizar a diversidade da comunidade microbiana, Marschner et al. (2001) utilizaram-se de perfis 16S do rDNA para examinar o efeito da espécie de planta, tipo do solo e região da raiz sobre a estrutura da comunidade bacteriana na rizosfera. Compararam 3 espécies de plantas - grão de bico, nabo e sorgo -, em 2 regiões da raiz - extremidade radicular e região de raízes maduras -, em 3 solos - arenoso, argilo-arenoso e argiloso - com suplementação de N ou sem o nutriente. Obtiveram um grande número de bandas comuns às 3 espécies de plantas, regiões da raiz e tipos de solo, mas com intensidades relativas das bandas variáveis, denotando populações de tamanhos diferentes. A suplementação com nitrogênio não alterou a comunidade microbiana, o que os autores consideraram surpreendente. Aventaram a hipótese de o nitrogênio não ser limitante nos solos estudados, motivo pelo qual sua adição não afetou as comunidades rizosféricas. Todavia, nos três solos, a composição da comunidade rizosférica foi espécie-específica, o que pode ser explicado pela variação na quantidade e composição química dos rizodepósitos. A composição da comunidade rizosférica foi afetada pelo tipo de solo, região da raiz e interações entre essas variáveis. A importância relativa dessas variáveis diferiu com a espécie de planta. Segundo os autores, "a importância relativa do tipo de solo sobre a estrutura da comunidade microbiana continua uma questão difícil e nenhum princípio geral emergiu ainda. Comparações de diferentes solos requerem consideração de muitas variáveis, incluindo diferenças entre nutrientes minerais, textura do solo, pH e matéria orgânica, estrutura física e históricos de manejo". Semelhantemente, Freitas et al. (2003) chegaram à conclusão de que havia envolvimento da fertilidade do substrato na promoção do crescimento de alface por isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*.

Passado muito tempo durante o qual as bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* foram extensivamente estudadas como RPCPs, mais recentemente outros gêneros bacterianos voltaram a ser estudados como promotores de crescimento, à semelhança do que se fazia na URSS em meados do século XX. Como exemplo disso pode-se citar o trabalho de Antoun et al. (1998), em que 266 isolados de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foram testados como promotores do crescimento em nabo.

Pesquisaram a produção de sideróforos, ácido cianídrico e ácido indolacético e a solubilização de fosfatos pelos isolados, concluindo que não houve correlação entre as características avaliadas *in vitro* e a capacidade de promoção do crescimento. No entanto, apresentam uma série de vantagens do uso de bactérias dessas gêneros, como a disponibilidade de tecnologias de produção de inóculo e de inoculação e o fato de que a genética dessas bactérias tem sido intensivamente estudada, tornando disponíveis todas as ferramentas genéticas necessárias.

Outras espécies bacterianas - *Comamonas acidovorans*, *Agrobacterium* sp. e *Alcaligenes piechaudii* - foram avaliadas quanto à produção de hormônios responsáveis pela elongação de raízes, mas trabalhos nessa linha ainda continuam longe de possibilitar aplicação prática dos resultados a que chegam. Há que se ressaltar, entretanto, que alguns hormônios podem ter papel não só no crescimento em si mas na percepção e transdução de sinais ambientais (Barka et al., 2000). É possível que esse fenômeno pudesse estar envolvido nos benefícios obtidos pela inoculação conjunta de *Bradyrhizobium japonicum* e isolados de *Serratia liquefaciens* e *Serratia proteamaculans* em soja (Dashti et al., 1998): houve aumento na massa de nódulos por planta e antecipação do início da fixação do nitrogênio, resultando em aumento no nitrogênio fixado.

É preciso ressaltar que, independentemente da elucidação dos motivos da variabilidade, os trabalhos com RPCPs têm continuado com todo o vigor. Há trabalhos inclusive com o controle de nematóides, que causam danos significativos a muitas culturas. Nessa linha, Siddiqui & Mahmood (1999) mencionam a existência de bactérias que agem como parasitas, cujo emprego como agente de controle biológico é facilitado pela especificidade entre parasita e nematóide hospedeiro, e de bactérias não parasitas, cujo efeito seria pela regulação da produção de metabólitos que reduzem a eclosão dos ovos e a atração das larvas pelas raízes ou pela degradação de exsudatos radiculares específicos que controlam o comportamento dos nematóides. Em trabalho posterior, o mesmo grupo de pesquisadores (Siddiqui et al., 2001) relatou a obtenção de um isolado de *Pseudomonas* spp. que promoveu o crescimento e diminuiu a multiplicação e a manifestação do nematóide *Meloidogyne incognita* em tomateiro, num sistema com inoculação da bactéria em presença de adubo orgânico e de DAP (fosfato de diamônio), recomendado como uma forma de manejo cultural para diminuir a incidência do problema.

Um dos poucos relatos mais recentes do uso comercial de inoculantes com RPCPs vem de um grupo de pesquisadores cubanos (Rodríguez & Fraga, 1999), pelo qual bactérias da espécie *Burkholderia cepacia* seriam utilizadas como inoculantes para solubilização de fósforo em cultivos agrícolas. Mesmo nesse caso, entretanto, há relatos de variabilidade de resultados, o que ocasionou a recomendação de que seja tentada a manipulação genética para dar mais estabilidade ao caráter. Mas há questionamentos ao uso dessa espécie como promotora de crescimento, já que causa graves infecções em humanos (Holmes et al., 1998).

Até pela forte possibilidade, já discutida, de que a interação com a microbiota nativa seja fator a afetar a atuação de rizobactérias, o uso de RPCPs deve ser facilitado em sistemas de manejo que contemplem algum tratamento do substrato, facilitando o

estabelecimento do microrganismo inoculado. Um sistema que vem sendo aplicado há muito em alguns países é a solarização, descrita por Katan et al. (1976). Nesse sistema o solo úmido é submetido a temperaturas altas, pela concentração do calor por meio de lençóis plásticos aplicados sobre ele. As altas temperaturas atingidas levam à eliminação de um grande número de patógenos, pragas e plantas daninhas (Ghini, 1997). Essa prática poderia facilitar a sobrevivência da RPCPs aplicadas ao solo, conforme aventam Gamliel & Stapleton (1993) para *Bacillus* spp. e isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. No Brasil, Sinigaglia et al. (2001) aplicaram com sucesso a técnica da solarização para controle de *Sclerotinia minor* e *Rhizoctonia solani* em alface, em áreas comerciais de produção.

Já foi comprovado que a alteração da microbiota nativa por variações drásticas em fatores abióticos pode interferir favorável ou desfavoravelmente no desempenho de RPCPs: Shishido & Chanway (1998) observaram que processos de armazenamento e congelamento de solos alteraram as respostas de abeto à inoculação de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., mas não conseguiram definir se os processos de armazenamento diminuíram a competição – do que resultou promoção do crescimento – ou eliminaram algum microrganismo que trabalhasse associado às RPCPs ou patógeno subclínico – do que não resultou promoção do crescimento. Não se deve esquecer, entretanto, que a alteração da microbiota nativa pode levar a consequências desfavoráveis: Os & Ginkel (2001) testaram os efeitos da inundação, fumigação e esterilização do solo por calor sobre a ocorrência de podridão causada por *Pythium* em bulbos de *Iris*, uma planta florífera. Observaram que o solo que não fora submetido a nenhum desses tratamentos é que apresentou os menores índices de doença, levando os autores a concluir que a microbiota nativa, eliminada pelos diferentes processos, era responsável pela supressividade à doença. Um dos caminhos sugeridos para a pesquisa com RPCPs, pois, é o seu emprego em sistemas em que as causas de sua variabilidade possam ser, pelo menos em parte, mais bem controladas. Os tratamentos do solo, quaisquer que sejam, podem eliminar parcialmente a microbiota nativa, mas o sucesso da inoculação com uma rizobactéria está condicionado ou à manutenção de uma comunidade benéfica ao microrganismo inoculado ou à eliminação da comunidade a ele antagônica. Esses problemas seriam minimizados, entretanto, se as RPCPs forem endofíticas, conforme sugerido por Chanway et al. (2000) para a inoculação de espécies florestais em viveiros de mudas.

Um capítulo à parte nas pesquisas com RPCPs no final do século XX e início do XXI tem sido a hipótese de que tais organismos atuem como indutores de resistência a patógenos e pragas. Na verdade, esse campo de estudos tem progredido rapidamente, com trabalhos bem sucedidos desenvolvidos em condições de campo (Murphy et al., 2000).

Resistência sistêmica induzida (RSI) é definida como um aumento da capacidade defensiva da planta contra um largo espectro de patógenos e pragas que é adquirida após estimulação apropriada (Ramamoorthy et al., 2001). Assim, o tratamento de sementes com RPCPs resulta em modificações na estrutura da parede celular e a mudanças bioquímicas e fisiológicas, que levam à síntese de proteínas e substâncias químicas envolvidas em mecanismos de defesa das plantas.

Muitas enzimas de plantas estão envolvidas em reações de defesa contra fitopatógenos, incluindo enzimas oxidativas, como peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO), que agem catalisando a formação de lignina, e outros fenóis oxidativos, que contribuem para a formação de barreiras defensivas, reforçando a estrutura celular (Chen et al., 2000).

A indução de resistência por RPCPs parece ser um fenômeno de ampla ocorrência: existem, por exemplo, relatos de indução de resistência a patógenos, como *Pythium* em abóbora (Chen et al., 2000 e Ongena et al., 2000) e em pepino (Bernardes, 2006) e *Rhizoctonia solani* em arroz (Nandakumar et al., 2001); há relatos de efeito contra vírus em tomateiro (Murphy et al., 2000 e Zehnder et al., 2000).

O contato com os patógenos induz a planta a produzir substâncias de defesa contra os invasores, de maneira semelhante ou não à induzida por RPCPs (Chen et al., 2000). Ainda que esse conhecimento já seja bem antigo (Chester, 1933, citado por Ramamoorthy et al., 2001), os mecanismos pelos quais a proteção é induzida começaram a ser desvendados bem mais recentemente. A proteção tanto pode ocorrer por reforço nas barreiras físicas contra o patógeno – como a produção de lignina (Chen et al., 2000) – quanto por aumento na síntese de enzimas e metabólitos com atividade antifúngica (Ongena et al., 2000). Isolados de *Pseudomonas fluorescens* tiveram eficácia comparável à do fungicida carbendazim, recomendado para o controle de *Rhizoctonia solani* em arroz (Nandakumar et al., 2001). É claro que esses modos de ação estão relacionados a doenças fúngicas; a proteção contra doenças causadas por vírus necessita de explicações, embora já tenha sido empregada com sucesso em experimentos em campo, com diminuição na incidência da doença e com aumento na produção de tomateiros (Zehnder et al., 2000). Existem isolados que conferem proteção contra mais de um patógeno, às vezes em mais de uma cultura. Buscar tais isolados seria muito importante (Ramamoorthy et al., 2001).

À semelhança de outros autores (Barka et al., 2000; Chanway et al., 2000; Sturz & Nowak, 2000), Ramamoorthy et al. (2001) afirmam que o uso de bactérias endofíticas como agentes de RSI é mais benéfico em plantas que se propagam vegetativamente, como banana, cana de açúcar e mandioca, já que a bactéria se propagaria para o órgão vegetativo utilizado para a propagação, evitando novas inoculações. O fato de as bactérias serem endofíticas obviaria, pelo menos parcialmente, aos problemas originados da competição com a microbiota indígena, o que deve fazer crescer as pesquisas com tais microrganismos.

Além do uso de RPCPs como indutoras de resistência sistêmica a doenças em plantas, descortinam-se atualmente algumas perspectivas quanto ao seu emprego em cultivos agrícolas. Depois de muito estudo sobre interações específicas com microrganismos simbióticos e com os patógenos, desenvolveu-se uma consciência da complexidade das interações rizosféricas, envolvendo tanto fungos micorrízicos quanto não micorrízicos, patogênicos e não patogênicos, bactérias, benéficas e patogênicas, além da própria planta e do solo circunjacente, e disso não poderão se esquivar os pesquisadores doravante. Não é mais possível estudar apenas o microrganismo isolado, sem levar em conta a complexidade do habitat em que deverá se estabelecer. Atkinson & Watson (2000) descrevem as conclusões de um encontro, nos Estados

Unidos, para o Estabelecimento de uma Rizosfera Benéfica, em 1998, em que identificaram que um dos aspectos mais importantes de uma rizosfera estabelecida é a presença de uma comunidade microbiana complexa e substratos orgânicos liberados das raízes. Relações benéficas, patogênicas e neutras são reguladas por complexos sinais moleculares que ocorrem aí. Nesse aspecto estão de acordo com Antoun et al. (1998), que dizem que uma das necessidades de pesquisa no futuro próximo é o estudo das trocas de sinais entre plantas e bactérias.

Os estudos, na grande maioria, ainda têm sido desenvolvidos em casa de vegetação, mas uma necessidade premente são os trabalhos em campo (Siddiqui & Mahmood, 1999). Tal fato parece já bem definido, uma vez que, na grande maioria dos artigos, relata-se não haver correlação entre o comportamento dos microrganismos *in vitro* ou em casa de vegetação e no campo (Freitas & Pizzinatto, 1997; Jjemba & Alexander, 1999; Cattelan et al., 1999, entre muitos outros). Assim, um caminho que vem sendo cada vez mais considerado é a definição de sistemas de manejo, de modo a facilitar o estabelecimento de microrganismos benéficos, em vez de simplesmente tentar introduzir um microrganismo num habitat que, muito provavelmente, já está em equilíbrio. Como já se provou que a rotação de culturas e o manejo de resíduos influenciam populações microbianas do solo, podem-se selecionar sistemas de produção que favoreçam o desenvolvimento de microrganismos benéficos, como, por exemplo, a manipulação de exsudatos – pela escolha adequada de cultivares vegetais – que favoreceriam a espécie de interesse ou o isolado introduzido (Sturz & Nowak, 2000). Por esse motivo, Sturz & Nowak (2000) sugerem que seqüências de culturas podem favorecer o estabelecimento de associações vantajosas de populações endofíticas bacterianas, levando ao desenvolvimento e manutenção de alelopatias benéficas hospedeiro-endófito. A utilização de rizobactérias em sistemas de produção de cultivos sustentáveis requererá estratégias para criar e manter populações bacterianas benéficas dentro das culturas (endófitos) e também nos solos em voltas dessas culturas. Como já foi dito neste capítulo, o emprego de microrganismos endofíticos pode obviar problemas de competição na rizosfera.

É claro que nada disso impede a busca por isolados bacterianos promotores do crescimento ou eficientes agentes de controle biológico de fitopatógenos. No entanto, é mais provável que a maioria dos eventos de controle biológico que ocorram naturalmente seja resultado de mistura de antagonistas e não de um único isolado. Por isso, misturas de isolados selecionados podem ter melhor resultado que a aplicação de um só (Ramamoorthy et al., 2001). Outro aspecto cuja pertinência parece maior a cada momento em que o conhecimento – e o eventual controle – do genoma de inúmeras espécies galga com rapidez de graus cada vez maiores é a manipulação genética. Seria desejável considerar as bactérias no melhoramento de plantas, isto é, usar no melhoramento plantas já com capacidade como hospedeiras de bactérias benéficas (Sturz & Nowak, 2000). Com isso concordam Rodríguez & Fraga (1999), para quem a manipulação genética é importante e deve ser executável, na prática, dirigindo-a para a maior estabilidade do caráter considerado. Segundo Atkinson & Watson (2000), relatando as conclusões do Encontro para o Estabelecimento de uma Rizosfera Benéfica, um dos desafios-chave para o futuro será ligar a dinâmica das populações rizosféricas, que têm sido melhor entendidas, com a dinâmica dos sistemas planta-raiz e sua longevidade. Disso depende o sucesso na inoculação de microrganismos em plantas e o manejo de microrganismos rizosféricos.



## Referências

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R. & LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.

ATKINSON, D.C. & WATSON, A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 99-104, 2000.

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

BARAZANI, O. & FRIEDMAN, E. Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 343-349, 2000.

BARKA, E. A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J. & AUDRAN, J. C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, p. 91-95, 2000.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, n. 8/9, p. 1225-1228, 1998.

BERGGREN, I.; VAN VUURDE, J. W. L. & MARTENSSON, A. M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae. **Applied Soil Ecology**, v. 17, p. 97-105, 2001.

BERNARDES, F. S. Rizobactérias na Indução de Resistência em Cultivos Hidropônicos. 2006. 67p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônômico.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: Melo, I. S. & Sanhueza, R. M. V. (Coords.). **Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, Manual Técnico. 1995. pp. 35-36.

BRANDÃO, E. M. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento em milho. Piracicaba, 1989. 133 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.

BRISBANE, P.G.; HARRIS, J.R. & MOEN, R. Inhibition of fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and fungicides. **Soil Biol. Biochem.**, v. 21, p. 1019-1025, 1989.

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 181-197, 1974.

BURR, T. J. & CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 1985.

BURR, T. J.; SCHROTH, M. N. & SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v. 68, p. 1377-1383, 1978.

- CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G. & FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.
- CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N. & PAULITZ, T. C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 13-23, 2000.
- CLINE, G. R., REID, C. P. P., POWELL, P. E. & SZANISZLO. The effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. **Plant Physiology**, v. 76, p. 36-40, 1984.
- COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2007. (no prelo)
- COELHO, L. F. Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas. 2006. 61p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônômico, IAC.
- COOPER, R. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. **Soils and Fertilizers**, v. 22, p. 327-333, 1959.
- DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R. & SMITH, D. L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. **Plant and Soil**, v. 200, p. 205-213, 1998.
- DAVIES, K. G. & WHITBREAD, R. A comparison of methods for measuring the colonisation of a root system by fluorescent pseudomonads?. **Plant and Soil**, v. 116, n. 2, p. 239-246, 1989.
- FREITAS, S. S. & PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 36-41, 1997.
- FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp.?. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, n. 1, p. 31-34, 1989.
- FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T. & DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 61-70, 2003.
- FROELICH, D.M. & FEHR, W. R. Agronomic performance of soybeans with differing levels of iron deficiency chlorosis on calcareous soil. **Crop Science**, v. 21, p. 438-441, 1981
- GAMLIEL, A. & STAPLETON, J. J. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. **Plant Disease**, v. 77, n. 9, p. 886-891, 1993.
- GAMO, T. *Azospirillum* spp. from crop roots: A promoter of plant growth. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 253-259, 1991.

- GHINI, R. (1997). Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 29p. Circular 1.
- GU, Y. H. & MAZZOLA, M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1155-1162, 2001.
- HARRISON, L. A.; LETENDRE, L; KOVACEVICH, P.; PERSON, E. & WELLER, D. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas aureofaciens*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 25, p. 215-221, 1993.
- HOHNADDEL, D. & MEYER, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4865-4873, 1988.
- HOLMES, A.; GOVAN, J. & GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: A threat to human health? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 221-227, 1998.
- HOPKINS, B. G.; JOLLEY, V. D. & BROWN, J. C. Variable inhibition of iron uptake by oat phytosiderophore in five soybean cultivars. **J. Pl. Nutrition**, v. 15, p. 125-135, 1992.
- HOWELL, C. R. & OKON, Y. Recent results of greenhouse and field trials on bacterial-induced plant growth promotion with no obvious symptoms of plant disease *In*: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1., 1987, Orillia. Proceedings of the First International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Orillia: Kloepper, J., 1987. p. 29-33.
- HOWELL, C. R. & STIPANOVIC, R. D. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology**, v. 70, p 712-715, 1980.
- JJEMBA, P. K. & ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 623-632, 1999.
- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H & GRINSTEM, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology**, v. 66, p. 683-688, 1976.
- KAVIMANDAN, S. K. & GAUR, A. C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. on phosphate uptake and yield of maize. **Current Science**, v. 40, p. 439-440, 1971.
- KING, E. O.; WARD, M. R. & RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **J. Lab. Clin. Med.**, p. 44:301-307, 1954.
- KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, IV, Angus, 1978. Proceedings, 2. p. 879-882, 1978.
- KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZ, M. & SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.
- LEBEN, S. D., WADI, J. A. & EASTON, G. D. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae* **Phytopathology**, v. 77, n. 11, p. 1592-1595, 1987.

- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 24, p. 187-209, 1986.
- MARSCHNER, P.C.; YANG, C.-H.; LIEBEREI, R. & CROWLEY, D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1437-1445, 2001.
- MERRIMAN, P. R.; PRICE, R. D.; KOLLMORGEN, J. F.; PIGGOTT, T. & RIDGE, E. H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 25, p. 219-226, 1974.
- MEYER, J. M. & ABDALLAH, M. A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. **Journal of General Microbiology**, v. 107, p. 319-328, 1978.
- MILLER, G. W.; PUSHNIK, J. C.; EMERY, T. E.; JOLLEY, V. D. & WARNIK, K. Y. Uptake and translocation of iron from ferrated rhodotorulic acid in tomato. **J. Plant Nutr.**, v. 8, p. 249-264, 1985.
- MORRIS, D. R.; LOEPPERT, R.H. & MOORE, T.J. Indigenous soil factors influencing iron chlorosis of soybean in calcareous soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 54, p. 1329-1336, 1990.
- MOZAFAR, A.; DUSS, F. & OERTLI, J. J. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the root exudates of two tomato mutants differently sensitive to Fe chlorosis. **Plant and Soil**, v. 144, p. 167-176, 1992.
- MURPHY, J. F.; ZEHNDER, G. W.; SCHUSTER, D. J.; SIKORA, E. J.; POLSTON, J. E. & KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection on tomato against tomato mottle virus. **Plant Disease**, v. 84, p. 779-784, 2000.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 603-612, 2001.
- OLSEN, N. W. & MISAGHI, I. J. Plant growth-promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v. 71, p. 1006, 1981.
- ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. & BELANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v. 49, p. 523-530, 2000.
- OS, G. J. VAN & GINKEL, J. H. VAN. Suppression of *Pythium* root rot in bulbous *Iris* in relation to biomass and activity of the soil microflora. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1447-1454, 2001.
- PAAU, A. S. & MCINTYRE, J. L. Development of PGPR inoculants: Challenges and priorities *In*: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, I., 1987, Orillia. Proceedings. Orillia: Kloepper, J., 1987. p. 44-49.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.

- RENGEL, Z.; ROSS, G. & HIRSCH, P. Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 99-113, 1998.
- RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROVIRA, A.D. Biology of the soil-root interface. In: HARLEY, J.L.; RUSSELL, R.S. (Ed.). The soil-root interface. New York: Academic Press, 1979. p. 145-160.
- SCOTT, E. M.; RATTRAY, E. A. S.; PROSSER, J. I.; KILLHAM, K.; GLOVER, L. A.; LYNCH, J. M. & BAZIN, M. J. A mathematical model for dispersal of bacterial inoculants colonizing the wheat rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, n. 10, p. 1307-1318, 1995.
- SHISHIDO, M. & CHANWAY, C. P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 939-947, 1998.
- SIDDIQUI, Z. A. & MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 167-179, 1999.
- SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A. & MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.
- SINIGAGLIA, C.; PATRÍCIO, F. R. A.; GHINI, R. MALAVOLTA, V. M.A; TESSARIOLI, J. & FREITAS, S. S. Controle de *Sclerotinia minor* e *Rhizoctonia solani* em alface pela solarização do solo e sua integração com controle químico. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 203-208, 2001.
- STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, p. 159-271, 1966.
- STURZ, A. V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 183-190, 2000.
- SUSLOW, T. V. & SCHROTH, M. N. Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v. 72, p. 199-206, 1982.
- TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; MIRANDA, M. A. C.; DEGASPARI, N. 7 CARMELLO, Q. A. C. Deficiência nutricional em soja cultivada em solo de cerrado devido à incorporação superficial do calcário. **O Agrônomo**, v. 41, p. 231-234, 1989.
- WALTER, A.; ROMHELD, V.; MARSCHNER, H. & CROWLEY, D. E. Iron nutrition of cucumber and maize: effect of *Pseudomonas putida* yc-3 and its siderophore. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 1023-1031, 1994.
- WELLER, D. M. & ZABLOTOWICZ, R. Recent results from field and greenhouse trials on biological controls of diseases with obvious visual and typical symptoms. In: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, I., 1987, Orillia. Proceedings. Orillia: Kloepper, J., 1987. p. 10-16.
- WOLTZ, S. S. Nonparasitic plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathology**, v. 16, p. 403-430, 1978.
- ZEHNDER, G. W.; YAO, C. B.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E. R. & KLOEPPER, J. W. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. **BioControl**, v. 45, p. 127-137, 2000.

# Capítulo 2

## A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas

Faustino ANDREOLA <sup>(1)</sup> e Silvana Aparecida Pavan FERNANDES <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

Os microrganismos são responsáveis pelos processos de mineralização, representando eles próprios uma quantidade considerável de nutrientes potencialmente disponíveis para as plantas.

Os nutrientes armazenados na biomassa microbiana podem atingir valores equivalentes a 100 kg de nitrogênio, 80 kg de fósforo, 70 kg de potássio e 11 kg de cálcio por ha. Como a biomassa dos microrganismos é reciclada cerca de 10 vezes mais rapidamente que a fração orgânica morta do solo, tem-se que a quantidade de nutrientes presentes nas células dos microrganismos é muito significativa perante a ciclagem de nutrientes em todo o ecossistema. O fluxo de N e P, via biomassa microbiana, pode alcançar valores equivalentes a 40 e 10-20 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> respectivamente (Holtz & Sá, 1995). Em condições ideais, a microbiota do solo permite que os nutrientes sejam, gradualmente, liberados para a nutrição das plantas, sem perdas por lixiviação. A diminuição da microbiota do solo prejudica a fixação temporária dos nutrientes, incrementando suas perdas e resultando no empobrecimento do solo (Hungria et al., 1997).

Em ecossistemas clímax, a microbiota encontra-se em equilíbrio com o solo, mantendo assim a sua biodiversidade. Todavia, toda e qualquer interferência do homem sobre aquele ecossistema resulta em quebra do equilíbrio e importantes alterações na microbiota podem ocorrer, nem sempre benéficas.

Desse modo, o uso de práticas agrícolas, como as que permitem a cobertura vegetal do solo, a incorporação de restos vegetais, a adubação orgânica, a rotação de culturas, o emprego de húmus de minhoca e outras, incluindo dentro desse contexto o plantio direto, pode resultar na melhoria da produtividade associada com qualidade e sustentabilidade.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisador, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A., Av. Servidão Ferdinando Tusset, s/n, Caixa Postal – 791, CEP – 89801-970, Chapecó, SC. E-mail: andreola@epagri.rct-sc.br;

<sup>(2)</sup> Pós-graduanda, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP, Caixa Postal-9, 13418-900, Piracicaba, SP.

A sustentabilidade de sistemas agrícolas pode ser definida como “o manejo adequado dos recursos para satisfazer as necessidades do homem, mas mantendo ou melhorando a qualidade do ambiente e os recursos naturais” (Hungria et al., 1997; Primavesi, 1997; Ambrosano, et al. 2000). Portanto, cabe aos profissionais da área dar ao solo o melhor manejo possível, permitindo a manutenção da atividade microbiana e, conseqüentemente, os níveis de fertilidade do solo.

## 2. Microbiota do Solo

O solo é constituído das frações orgânica e inorgânica (rochas e minerais) e é habitado por inúmeras espécies, formando um ecossistema.

Os microrganismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Assim, os microrganismos do solo desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos, atuando, portanto, como fonte e dreno de nutrientes para o crescimento das plantas.

Os microrganismos do solo, também chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem somente 1 a 4 % do carbono total e ocuparem menos de 5 % do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade dos microrganismos é bastante elevada. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, somente 15% a 30% das bactérias e 10% dos fungos encontram-se em estado ativo. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo.

De uma maneira geral, os microrganismos estão envolvidos em vários processos de grande interesse agrônomo, particularmente no que se refere à agricultura orgânica e à rotação de culturas. Dentre os processos podem ser destacados: a) decomposição e ressíntese da matéria orgânica, b) ciclagem de nutrientes, c) as transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre), d) fixação biológica do nitrogênio, e) a ação antagônica aos patógenos, f) produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento, entre outros.

## 3. Agricultura Orgânica

### 3.1 Definições

A agricultura orgânica da atualidade representa a fusão de diferentes correntes de pensamento. Basicamente, podemos agrupar o movimento orgânico em quatro

grandes vertentes: agricultura biodinâmica, biológica, orgânica e natural (Ehlers, 1999; Darolt, 2000; Ambrosano et al., 2000). Em complemento, o quadro 1 apresenta os princípios básicos e particularidades dessas correntes de pensamento que originaram os métodos de produção.

Nos anos 70, o conjunto dessas correntes passou a ser chamado de agricultura alternativa. Esse termo surgiu em 1977, na Holanda, quando o Ministério da Agricultura e Pesca publicou um importante relatório, contendo a análise de todas as correntes não convencionais de agricultura, que foram reunidas sob a denominação genérica de agricultura alternativa. Por fim, já no final dos anos 80 e durante a década de 1990, o conceito amplamente difundido foi o de agricultura sustentável (Hileman, 1990).

De acordo com a literatura, pode-se dizer que a maioria das definições de agricultura sustentável transmite uma visão que garanta: a manutenção a longo prazo dos recursos naturais e da produtividade agrícola; o mínimo de impactos adversos ao ambiente; um retorno adequado aos produtores; a otimização da produção com um mínimo de insumos externos; a satisfação das necessidades humanas, atuais e futuras, de alimento e renda e o atendimento das necessidades sociais das famílias e das comunidades rurais (Ehlers, 1999; Darolt, 2000).

Em síntese, destaca-se que o ponto comum entre as diferentes correntes que formam a base da agricultura orgânica é a busca de um sistema de produção sustentável no tempo e no espaço, mediante o manejo e a proteção dos recursos naturais, sem a utilização de produtos químicos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, mantendo o incremento da fertilidade e a atividade microbiana dos solos, a diversidade biológica e respeitando a integridade cultural dos agricultores (Darolt, 2000).

### **3.2 Diversificação e Integração de Sistemas**

A agricultura orgânica entende a produção como sujeita aos processos ecológicos, ou seja, os campos de cultura estão sujeitos a ciclos de nutrientes, interação de pragas e predadores, competição entre culturas e plantas invasoras; o entendimento dessa dinâmica complexa é a chave de um manejo eficiente. Os sistemas mais diversificados apresentam processos ecológicos mais completos do que aqueles altamente simplificados, como os sistemas convencionais e em particular os monocultivos (Darolt, 2000, Primavesi, 1997).

A diversificação da agricultura pode ser alcançada com um manejo que utilize o policultivo, sistemas agroflorestais, rotações de culturas, cultivos de cobertura, cultivo mínimo, uso de composto e esterco, adubação verde, máxima reciclagem de matéria orgânica, utilização de húmus de minhoca e outras práticas que podem colaborar em muito como o plantio direto, a integração de agricultura e pecuária de grandes e pequenos animais, a piscicultura e a recuperação de matas de refúgios. Esse tipo de manejo potencializa a reciclagem de nutrientes, melhora o microclima local, diminui patógenos e insetos-praga, elimina determinados contaminantes e conserva melhor a fertilidade do solo e a qualidade da água (Primavesi, 1997; Darolt, 2000, Ambrosano et al., 2000).



**Quadro 1.** Princípios básicos e particularidades dos principais movimentos que originaram os métodos orgânicos de produção.

Movimento ou corrente	Princípios básicos	Particularidades
Agricultura Biodinâmica (ABD)	<p>É definida como uma “ciência espiritual”, ligada à antroposofia, em que a propriedade deve ser entendida como um organismo. Preconizam-se práticas que permitam a interação entre animais e vegetais; respeito ao calendário astrológico biodinâmico; utilização de preparados biodinâmicos, que visam reativar as forças vitais da natureza, além de outras medidas de proteção e conservação do meio ambiente.</p>	<p>Na prática, o que mais diferencia essa agricultura das outras correntes orgânicas é a utilização de alguns preparados biodinâmicos (compostos líquidos de alta diluição, elaborados a partir de substâncias minerais, vegetais e animais) aplicados no solo, na planta e no composto, baseados numa perspectiva energética e em conformidade com a disposição dos astros.</p>
Agricultura Biológica (AB)	<p>Não apresenta vinculação religiosa. Na sua criação o modelo foi baseado em aspectos sócio-econômicos e políticos: autonomia do produtor e comercialização direta. A preocupação era a proteção ambiental, qualidade biológica do alimento e desenvolvimento de fontes renováveis de energia. Os princípios da AB são baseados na saúde da planta, que está ligada à saúde dos solos. Ou seja, uma planta bem nutrida, além de ficar mais resistente a doenças e pragas, fornece ao homem um alimento de maior valor biológico.</p>	<p>Não considera essencial a associação da agricultura com a pecuária. Recomenda o uso de matéria orgânica, que pode vir de fontes externas à propriedade, diferentemente do que preconizam os biodinâmicos. Segundo seus precursores, o mais importante é a integração das propriedades e o conjunto das atividades socioeconômicas regionais. Este termo é mais utilizado em países europeus de origem latina (França, Itália, Portugal e Espanha). Segundo as normas uma propriedade “biodinâmica” ou “orgânica” é também considerada como “biológica”.</p>
Agricultura Natural (AN)	<p>O modelo apresenta uma vinculação religiosa (Igreja Messiânica). O princípio fundamental é o de que as atividades agrícolas devem respeitar as leis da natureza. Por isso, na prática não é recomendado o revolvimento do solo, nem a utilização de compostos orgânicos com dejetos de animais.</p>	<p>Na prática utilizam-se produtos especiais para preparação de compostos orgânicos, chamados de microrganismos eficientes. Esses produtos têm sido comercializados e possuem fórmula e patente detidas pelo fabricante. Esse modelo está dentro das normas da agricultura orgânica.</p>
Agricultura Orgânica (AO)	<p>Não tem ligação a nenhum movimento religioso. Baseia-se na melhoria da fertilidade do solo por um processo biológico natural, pelo uso da matéria orgânica. Como as outras correntes, essa proposta é totalmente contrária à utilização de adubos químicos solúveis. Os princípios são, basicamente, os mesmos da agricultura biológica.</p>	<p>Apresenta um conjunto de normas bem definidas para produção e comercialização da produção, determinadas e aceitas internacional e nacionalmente. O nome “agricultura orgânica” é utilizado em países de origem anglo-saxã, germânica e latina. Pode ser considerado como sinônimo de agricultura biológica e engloba as práticas da agricultura biodinâmica e natural.</p>

A utilização de leguminosas na agricultura, por sua característica de apresentar simbiose com rizóbio e fungos micorrízicos e grande capacidade de exploração do solo, é de fundamental importância tanto para o equilíbrio biológico como para a reciclagem de nutrientes. Com isso, há maior equilíbrio nutricional das plantas e maior resistência do sistema, ao aparecimento de pragas e doenças (Holtz & Sá, 1995; Ambrosano et al., 2000).

Dentro do contexto de uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente, tem-se a adubação verde. Com tal prática é possível recuperar a fertilidade do solo, proporcionando aumento do teor de matéria orgânica, da capacidade de troca de cátions e da disponibilidade de macro e micronutrientes; formação e estabilização de agregados; melhoria da infiltração de água e aeração; diminuição diuturna da amplitude de variação térmica; controle dos nematóides e, no caso das leguminosas, incorporação do nitrogênio ao solo pela fixação biológica (Ambrosano et al., 2000).

As relações simbióticas mutualísticas com fungos, como por exemplo as micorrizas, são associações fundamentais na agricultura orgânica. De modo geral, a micorrização resulta na ação direta do fungo na absorção de nutrientes e indireta na fixação biológica de nitrogênio, mineralização e/ou solubilização de nutrientes na micorrizosfera, além de atuar na proteção contra fungos patogênicos (Silveira, 1992).

A crescente preocupação com o impacto ambiental da exploração agrícola tem estimulado a adoção de sistemas conservacionistas de manejo do solo. O plantio direto, associado ao retorno de resíduos culturais, tem evoluído sensivelmente dentro do conceito de sistema conservacionista. Alguns pontos têm sido freqüentemente considerados como relevantes nesse sistema: redução sensível das perdas de solo por erosão, aumento da matéria orgânica e da fertilidade do solo e menor custo de produção em relação ao preparo convencional (Sá, 2001).

Os sistemas conservacionistas de manejo do solo influenciam a distribuição horizontal e vertical da biota do solo (Arshad et al., 1990). Da mesma forma, a taxa de adição e os tipos de resíduos culturais mantidos na superfície do solo alteram a atividade da biomassa microbiana do solo (Franzluebbers et al., 1994).

## **4. Manejo das Culturas**

### **4.1 Sistemas de manejo e a microbiota do solo**

Até pouco tempo atrás, mais especificamente no auge da chamada “revolução verde”, os métodos de manejo do solo ou de culturas não consideravam a microbiota do solo, com exceção daqueles microrganismos que formam simbiose.

A contribuição dos microbiologistas de solo era pouca em decorrência de que trabalhos levados a efeito com êxito em laboratório não tinham a mesma reprodutibilidade no campo. Todavia, o que se observa atualmente é uma tendência em sentido contrário, ou seja, o uso cada vez maior de adubação orgânica, adubação verde, práticas de manejo (plantio direto, cultivo mínimo, preparo reduzido), rotação

de culturas, entre outros, com o intuito de melhorar cada vez mais o ambiente do solo a fim de que um equilíbrio entre as populações de organismos do solo se estabeleça e seja mantido, com vantagens para a sustentabilidade da agricultura.

No solo a matéria orgânica é acumulada por meio da biomassa e detritos orgânicos. Em ecossistemas equilibrados os níveis de matéria orgânica são determinados pelo balanço da produção de biomassa, estabilização de detritos e a mineralização dos materiais orgânicos. Quando esse balanço é rompido pela introdução de práticas agrícolas ou mudanças no sistema de cultivo que alterem os padrões de produção primários, bem como a estabilização e perda de matéria orgânica, os conteúdos de matéria orgânica do solo são modificados. Estes, por sua vez, alteram a estrutura das comunidades e por conseqüência a atividade microbiana do solo. Isto porque existe uma estreita relação entre matéria orgânica (quantidade e qualidade) e a biomassa microbiana do solo (Cattelan & Vidor, 1990; Ruedell, 1995).

Follet & Schimel (1989) avaliaram a alteração da biomassa microbiana do solo submetido ao manejo com plantio direto, preparo com cobertura morta e pousio. Verificaram que após dezesseis anos os níveis de biomassa microbiana decresceram para 57, 52 e 36 % para plantio direto, cobertura morta e pousio, respectivamente, em relação à pastagem nativa. A atividade microbiana, medida em laboratório pelo desprendimento de CO<sub>2</sub>, mostrou a mesma tendência, ou seja, declinou com o aumento da intensidade de preparo. Segundo os autores, o aumento da intensidade de preparo diminui a habilidade do solo em imobilizar e conservar N no solo.

Balota *et al.* (1998), em experimento que vinha sendo realizado há doze anos, avaliaram durante três anos a biomassa e a atividade microbianas de um solo submetido a diferentes sucessões de cultura nos sistemas de plantio direto e convencional. Os autores verificaram que as sucessões praticamente não alteraram a biomassa nem a atividade microbiana. Entretanto, observaram que no sistema de plantio direto a biomassa microbiana foi bem maior que no sistema convencional. Observaram também que no sistema de plantio direto houve menor perda de carbono via respiração, indicando com isso a possibilidade de aumento do estoque de carbono em longo prazo.

Avaliando a biomassa microbiana e a atividade da desidrogenase no solo submetido a diferentes sucessões nos sistemas de plantio direto e convencional, Fernandes (1995) obteve valores de biomassa microbiana no plantio direto 42% superiores em relação ao plantio convencional. Na soja em rotação, houve um incremento de 23% no valor de biomassa microbiana, em relação à soja contínua. A atividade da desidrogenase do solo seguiu a mesma tendência dos valores obtidos para biomassa microbiana, obtendo-se uma correlação significativa entre ambas.

Scholles & Vargas (2000) utilizando diferentes preparos do solo (convencional, reduzido e plantio direto), duas sucessões de culturas, duas profundidades de amostragem do solo (0-5 e 5-15 cm) em quatro épocas, verificaram que tanto a biomassa quanto a atividade microbianas apresentaram maiores valores na camada de 0-5 cm, no sistema de plantio direto e reduzido e na sucessão aveia preta + ervilhaca/milho + caupi (*Vigna sinensis*).

## 4.2 Alterações da Microbiota Causadas pelo Manejo

Desde que se conseguiu produzir economicamente sem revolver o solo, isto é, no sistema plantio direto, alguns atributos físicos e químicos apresentaram-se diferentes daqueles encontrados no sistema convencional. Tais atributos, sendo alterados, causam alterações na dinâmica das populações de microrganismos do solo.

O principal atributo físico alterado, quando se migra do sistema convencional de preparo do solo para o sistema de plantio direto, é a densidade do solo (Doran, 1980; Sá, 2001). Esta sofre um aumento resultante principalmente do tráfego das máquinas na superfície do solo. Esse aumento resulta de uma diminuição de macroporos e aumento de microporos no solo. Isso leva a maior retenção de água no solo e sua permanência por um período mais longo. Em virtude disso, pode aumentar a comunidade de microrganismos anaeróbios resultando, em termos práticos, em um maior acúmulo de matéria orgânica, porque em condições anaeróbias sua decomposição é incompleta.

Já foi observado que no sistema plantio direto ocorre um aumento no estoque de carbono orgânico no solo em relação ao sistema convencional (Doran, 1980). Esse aumento também foi acompanhado de um aumento da biomassa do solo sob aquele sistema. O autor também verificou que houve alteração na estrutura da comunidade, ou seja, aumentou consideravelmente as populações de microrganismos denitrificadores e anaeróbios facultativos.

No sistema de plantio direto a proliferação das raízes nas camadas superficiais (mais ou menos 5 cm de profundidade) do solo é freqüentemente maior que aquele das culturas implantadas em sistema convencional. Como a exsudação radicular fornece energia e nutrientes para os microrganismos, a biomassa microbiana é maior no primeiro sistema. Quando amostrado em maiores profundidades (25 cm), a biomassa tende a ser maior no solo lavrado. Isso não é particularmente surpresa, porque, se a produção de raízes é um dos principais fatores determinantes da biomassa microbiana, a presença das raízes em profundidade tende a correlacionar-se com a biomassa ao longo do perfil (Lynch, 1984).

Vários trabalhos, entre eles os de Fernandes (1995), Ruedell (1995), Gassen & Gassen (1996), Anghinoni & Salet (1998) e Scholles & Vargas (2000), relatam que a fertilidade do solo é maior no sistema de plantio direto que no convencional, especialmente nas camadas mais superficiais do solo. A fertilidade do solo está estreitamente relacionada com a matéria orgânica e a biomassa microbiana do solo (Fernandes, 1995; Scholles & Vargas, 2000).

O uso de adubos orgânicos pode provocar alterações na microbiota. Indicando essa tendência, pode-se citar o trabalho de Peacock et al. (2001), que encontraram resposta na estrutura da comunidade microbiana do solo em decorrência do uso de adubo orgânico (fezes, urina e cama de vacas leiteiras estabuladas). Nesse trabalho, a aplicação de adubo orgânico, por cinco anos, resultou em um aumento significativo nos teores de carbono orgânico e nitrogênio e na biomassa microbiana do solo. Além disso, proporcionou alterações na estrutura da comunidade microbiana. As práticas que aumentam carbono no solo e proporcionam mineralização lenta de nutrientes podem resultar em uma maior e mais estável comunidade microbiana.

O aumento da atividade biológica decorrente do incremento da matéria orgânica no solo pode, por consequência, aumentar a estabilidade dos agregados em água. Isto porque, além dos metabólitos resultantes da atividade em si (Tisdall & Oades, 1982), as hifas fúngicas atuam protegendo tais agregados (Lynch, 1984).

Kushwaha et al. (2001) verificaram correlação positiva da biomassa microbiana do solo, nitrogênio total e carbono orgânico com os macroagregados. De acordo com esses autores, a biomassa microbiana e seus metabólitos unem os microagregados com reflexos no aumento dos macroagregados do solo.

### 4.3 As Simbioses e o Manejo

Em geral, tem sido verificado que os microrganismos simbioses, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) mostram melhor adaptação ao sistema de plantio direto em relação ao sistema convencional.

Fontaneli et al. (2000) avaliaram a nodulação da soja em quatro sucessões de culturas em sistema de plantio direto. Após cinco anos, verificaram abundante nodulação da soja independentemente do tipo de cultura antecedente. No mesmo sentido são as pesquisas de Campos et al. (2001) que avaliaram a eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em sistema de plantio direto e não encontraram resposta à inoculação.

Os autores concluíram que a ausência de resposta da soja à prática de inoculação pode ser atribuída às populações naturalizadas de *Bradyrhizobium*, em número adequado e eficiente, e às condições favoráveis à fixação biológica do nitrogênio, como temperatura e umidade adequadas do solo, proporcionadas pelo sistema.

A associação micorrízica também sofre influência do pré-cultivo e do manejo do solo. Oliveira & Sanders (1999) observaram que nos tratamentos com solo nu e com distúrbio mecânico houve redução na densidade de esporos de FMAs e na colonização radicular do feijoeiro. A colonização foi maior nas parcelas anteriormente cultivadas com cereais, especialmente no pré-cultivo com milho.

Pelo fato de fungos micorrízicos não se propagarem na ausência de hospedeiro, é natural que métodos de manejo que causem distúrbio ao solo ou que impeçam o desenvolvimento de raízes hospedeiras causarão danos ao desenvolvimento desses microrganismos.

Já se verificou aumento tanto na colonização radicular quanto no número de propágulos de fungos micorrízicos no sistema de plantio direto em relação ao convencional (McGonigle & Miller, 1993) ou em sistemas em que o solo seja menos perturbado (McGonigle & Miller, 1996). Todavia, isso parece não ser uma regra e depende muito da planta hospedeira, das espécies de fungos micorrízicos predominantes e da especificidade. Isso pode ser observado no trabalho de Fernandes (1995), onde foram encontrados valores maiores de colonização de raízes da aveia em plantio direto que no convencional; porém, na soja a colonização foi semelhante entre os sistemas.

#### 4.4 Rotação de Culturas e Mineralização do N Orgânico

A rotação de culturas é uma prática recomendada para reduzir o potencial de inóculo de patógenos para a cultura sucessora ou interromper o ciclo de determinadas pragas. Essa prática constitui-se num dos principais fatores determinantes da sustentabilidade do sistema de plantio direto e da agricultura orgânica.

Na rotação de culturas, o tipo (leguminosa ou não) e o destino (produção de grãos, de forragem ou de cobertura do solo/adubação verde) da cultura precedente, influencia diferentemente a biomassa microbiana do solo. Isso porque os resíduos culturais são diferentes, tanto em quantidade quanto em qualidade.

Como visto anteriormente, não há como dissociar a microbiota do solo da matéria orgânica e, no sistema de rotação de culturas, esta e o fornecimento de nutrientes. Isto é particularmente importante para a disponibilidade de N (nutriente requerido em grande quantidade) para a cultura que a sucede, uma vez que a disponibilidade é influenciada pela mineralização e imobilização do N contido nos resíduos orgânicos. Esses dois processos ocorrem simultaneamente e são levados a efeito pela comunidade microbiana do solo, cuja atividade é alterada por vários fatores, com destaque para a relação carbono/nitrogênio (C/N).

De acordo com Stevenson (1986) uma relação C/N maior que 30 leva à imobilização de N; entre 20 e 30 a mineralização é igual à imobilização e com C/N menor que 20 predomina a mineralização.

Isto posto, serão discutidos alguns aspectos da rotação de culturas com base na disponibilidade de resíduos culturais aos microrganismos do solo e na possibilidade de fornecimento de N para a cultura subsequente.

Se uma gramínea é cultivada para cobertura do solo ou para adubação verde, na época do florescimento é manejada (rolagem ou dessecação ou incorporação ao solo). Nessa fase, apresenta uma relação C/N ao redor de 40 (Quadro 2). Essa relação, como visto anteriormente, é muito alta para uma adequada mineralização, podendo haver, pelo menos inicialmente, imobilização do N mineralizado. Daí, dependendo do tipo de cultura subsequente, pode haver deficiência de N, mesmo havendo adequada quantidade desse nutriente (Quadro 2) passível de se tornar disponível.

Situação assim foi encontrada por Ferro (1991) e Andreola (2001) que observaram efeito negativo no rendimento do milho produzido depois que a aveia preta foi cultivada para adubação verde. Aita et al. (1991) também obtiveram apenas 51% do rendimento do milho em relação à testemunha nitrogenada, depois que a aveia preta foi cultivada para cobertura do solo e adubação verde.

O contrário tem sido observado com relação a leguminosas cultivadas após a aveia preta. Derpsch et al. (1985) encontraram efeito benéfico da aveia sobre o rendimento do feijoeiro; Ferro (1991) obteve aumento de até 14% no rendimento da soja e Scholles et al. (1983) observaram que a incorporação de palha de trigo não afetou o rendimento da soja.

Portanto, uma gramínea ou outra espécie que não fixa nitrogênio atmosférico, quando cultivada após uma gramínea (alta relação C/N), tem que receber adubação

nitrogenada para expressar todo o seu potencial produtivo. Já as leguminosas, ao que tudo indica, não são afetadas, justamente pela sua característica de fixar o N atmosférico em associação com rizóbio.

Se a gramínea é cultivada para produção de grãos ou de forragem para fenação ou silagem, não se espera que o N se torne disponível para a cultura seguinte. A maior parte do N absorvido é retirada da área quando os grãos são colhidos e praticamente todo o N é removido quando o destino da cultura é a fenação ou a silagem, permanecendo apenas aquele contido nas raízes (Salisbury & Ross, 1992).

**Quadro 2.** Produção de matéria seca, quantidade de N absorvido e relação C/N de algumas espécies de inverno utilizadas como adubo verde no Paraná e Santa Catarina.

Espécies	M. Seca	N-abs.	Relação C/N	Fonte
	kg/ha	kg/ha		
Aveia preta (gramínea)	5580	-	28	(1)
	7700	107	41	(2)
	8670	115	40	(3)
Centeio (gramínea)	3330	-	42	(1)
	6200	60	40	(2)
	6500	124	29	(3)
Chincho (leguminosa)	2060	-	22	(1)
	3900	105	14	(2)
	5910	108	25	(3)
Ervilhaca (leguminosa)	2710	-	23	(1)
	5000	170	11	(2)
	6050	139	18	(3)
Nabo forrageiro (crucífera)	4750	-	21	(1)
	3500	81	14	(2)
	7520	163	16	(3)
Gorga (cariofilácia)	3800	62	23	(2)
	5600	184	12	(3)
Tremoço branco (leguminosa)	2710	-	23	(1)
	6720	250	17	(2)
Ervilha-forrageira (leguminosa)	3000	87	13	(2)
	4810	102	14	(3)

Derpsch, 1985 citado por Monegat (1991); (2) Costa et al. (1992); (3) Monegat (1991)

O Quadro 3 mostra a relação C/N da palha (resíduo cultural) de algumas gramíneas. Nele pode-se observar uma relação C/N excessivamente alta, devendo ocorrer mineralização lenta e alta taxa de imobilização. Por isso, se a cultura seguinte for gramínea, a adubação nitrogenada integral deve ser considerada. Se for leguminosa e formar simbiose eficiente, aquela relação não terá efeito sobre o desenvolvimento da cultura.

O cultivo associado de uma gramínea e uma não-gramínea, para adubação verde, pode proporcionar aumentos significativos nos rendimentos das culturas subseqüentes. Exemplos disso são os trabalhos de Ferro (1991), que cultivou aveia preta associada com tremoço e obteve incrementos significativos nos rendimentos tanto de milho quanto de soja; de Andreola et al. (1998a) que obtiveram em média 220 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de feijão a mais por causa do uso da aveia preta associada com nabo forrageiro e, ainda, de Andreola (2001) que avaliou associações entre gramíneas (aveia preta, centeio e triticale) e não-gramíneas (nabo forrageiro, ervilhaca e gorga). O último autor obteve aumentos significativos nos rendimentos de grãos de milho e de feijão, cultivados subseqüentemente às associações. O fundamento desses fatos pode ser visto no Quadro 2, em que a relação C/N das leguminosas utilizadas para adubação verde é bastante baixa. Na mistura com gramíneas, o resultado é uma relação menor que a da gramínea e, portanto, mais favorável à decomposição. Além disso a quantidade de N acumulado pela leguminosa é bastante considerável (Quadro 2).

**Quadro 3.** Relação C/N da palha (restos culturais) de algumas gramíneas.

Espécie	Relação C/N	Fonte
Trigo	80	Lynch (1986)
Aveia preta	74	Tedesco (1983) <sup>(1)</sup>
Milho	112	Costa et al. (1989)
Milho	86	Rowell (1994)

<sup>(1)</sup> Tedesco (1983) citado por Monegat (1991)

Quando se trata do uso de leguminosas como cobertura do solo ou adubação verde, a literatura que mostra o efeito benéfico sobre a cultura subseqüente, é bastante farta (Fundação Cargill, 1984; Rosolem, 1987; Aita et al., 1991; Ferro, 1991; Andreola et al., 1998b; Andreola, 2001). Nela verifica-se que, em alguns casos, a leguminosa proporciona rendimento da cultura sucessora superior ao tratamento com dose integral de N (Fundação Cargill, 1984; Aita et al., 1991; Kanthack et al., 1991); em outros casos o fornecimento de N pela leguminosa é semelhante ao fornecido pela adubação mineral (Rosolem, 1987; De-Polli & Chada, 1989; Ferro, 1991; Andreola et al., 1998b; Andreola, 2001); porém, em outros casos ainda pode ser necessária a adição de doses complementares de N (Baldissera e Scherer, 1991).

As diferenças acima apontadas podem ser causadas pelo manejo que se dá à leguminosa ou a exigência nutricional da cultura sucessora. Nos Estados de São Paulo (Fundação Cargill, 1984) e Rio de Janeiro (De-Polli & Chada, 1989), quando a mucuna atinge o estágio de florescimento pleno, é incorporada ao solo ou então é cortada e deixada na superfície do solo e o milho é semeado em seguida.



Praticamente todo o N requerido pela cultura do milho provém da decomposição da mucuna, pois as condições climáticas são favoráveis. Já no Paraná (Calegari, 1991) e Santa Catarina (Baldissera & Scherer, 1991; Andreola et al., 1998b), onde o objetivo principal do cultivo da mucuna preta é a manutenção do solo coberto durante o inverno, a mucuna é manejada de forma diferente. Ou seja, a mucuna é semeada entre as fileiras por ocasião do florescimento de milho. Após a colheita do milho, a mucuna continua vegetando, até a ocorrência das primeiras geadas, quando ela é “queimada”. Assim, juntamente com a palhada do milho, ela permanece na superfície do solo durante todo o inverno. Por ocasião da implantação da safra de verão é incorporada ao solo ou então permanece como cobertura morta na superfície do solo. O milho é semeado em cultivo mínimo (abertura de sulcos para a semeadura) ou no sistema de plantio direto.

Nesse último sistema, a contribuição da mucuna ao fornecimento de N para o milho tem sido variável. Calegari (1991) encontrou 36%, enquanto Baldissera & Scherer (1991) obtiveram 55% de N proveniente da mucuna. Já Andreola et al. (1998b), em experimento com cinco anos de duração, não encontraram diferença entre os tratamentos com e sem mucuna no rendimento de grãos de milho. Entretanto, se a cultura sucessora é menos exigente em N, como é o caso da cebola, praticamente todo o N pode ser conseguido da mucuna (Costa et al., 1992).

A permanência dos resíduos de mucuna na superfície do solo por um longo período, como no caso do sistema adotado no Paraná e Santa Catarina, pode levar a perdas de N. Embora a temperatura média durante o inverno não seja adequada à mineralização, ela sempre ocorre. Isso porque a temperatura não é constantemente baixa, ocorrendo horas do dia ou mesmo alguns dias com temperaturas elevadas, o que tem levado à decomposição de boa parte da mucuna, pelo estímulo à atividade microbiana.

Se for considerado que as chuvas naquelas regiões ocorrem normalmente durante todo o inverno e que a maior parte do N contido na mucuna encontra-se nas folhas, na época em que a geada a “queimou”, é possível que perdas consideráveis de N possam ocorrer por lixiviação.

Leguminosas de inverno, como é o caso da ervilhaca produzida para adubação verde, têm proporcionado rendimentos de milho e de feijão semelhantes à testemunha nitrogenada (Andreola, 2001), especialmente em plantio direto, onde as plantas de ervilhaca, após o manejo, permanecem na superfície do solo e a decomposição é mais lenta. Isso permite que o N proveniente da leguminosa seja melhor aproveitado pela cultura sucessora.

Quando o cultivo de leguminosas tem por objetivo a produção de grãos, a maior parte do N assimilado é exportada pela colheita (Salisbury & Ross, 1992). Com relação ao cultivo de leguminosas para produção de feno ou silagem, toda a parte aérea é retirada da área e por isso não se deve esperar fornecimento de N para a cultura seguinte. Entretanto, contrariando as expectativas, Dhein et al. (1987), citados por Fontaneli et al. (2000), não obtiveram resposta a doses de N (0, 45, 90 e 135 kg/ha) no rendimento de milho e de feijão, cultivados em área onde havia sido produzida alfafa para fenação, durante oito anos.

Embora a maioria dos trabalhos citados neste tópico tratem de alguma maneira da rotação de culturas, os dados referentes ao aproveitamento do N contido nos resíduos dizem respeito apenas à primeira cultura que sucessora. Isso, de certa forma, tem a ver com a dinâmica do elemento no sistema, diferente dos demais nutrientes, pois é considerado que o N não tem poder residual por ser facilmente perdido por volatilização e lixiviação.

Teoricamente, é possível haver efeito residual de N. Como visto anteriormente, com o uso de resíduos de relação C/N alta pode demorar bastante tempo para começar a haver liberação de N. Dessa maneira, a primeira cultura sucessora não teria benefício, ao passo que a segunda poderia conseguir algum N proveniente daqueles resíduos. Todavia, na prática, o que se recomenda para uma cultura não-leguminosa após o cultivo de uma cultura que deixa resíduos de alta C/N, é a adubação integral com N. Isso reduz a relação C/N, aumenta a mineralização e pode não sobrar N para proporcionar efeito residual sobre a segunda cultura. Já se a cultura sucessora é uma leguminosa eficiente na fixação de N<sub>2</sub>, não se recomenda adubação nitrogenada e a relação C/N não tem tanta importância.

## 5. Considerações Finais

Como discutido em alguns tópicos deste capítulo, as práticas de manejo do solo ou das culturas interferem na estrutura e, também, na atividade da comunidade microbiana do solo. Considerando que a agricultura sustentável, nas nossas condições de solo e clima, depende consideravelmente da reciclagem dos nutrientes da matéria orgânica e considerando também, que a microbiota do solo desempenha um papel de fundamental importância nesse processo, é possível inferir-se que a criação de condições favoráveis à comunidade microbiana e a sua atividade é de fundamental importância.

Os sistemas de produção menos agressivos ao ambiente remetem a sistemas complexos, onde todos os fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, bem como as suas interações, têm que ser considerados. O entendimento das interações, especialmente aquelas que envolvam a microbiota do solo e o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a maximização de seus benefícios em prol da agricultura sustentável, constitui-se, atualmente, num dos grandes desafios da pesquisa na área agrônômica.

## Referências

AITA, C.; CERETTA, C.A.; FAGGION, F. & CASSOL, L.C. Suprimento de nitrogênio para o milho através de espécies de inverno no sistema de cultivo mínimo. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE ADUBAÇÃO VERDE E ROTAÇÃO DE CULTURAS, 3. Cascavel, PR. **Resumos...**, OCEPAR, 1991. p.131.

AMBROSANO, E.J.; MURAOKA, T.; AMBROSANO, G.M.B.; TRIVELIN, P.C.º; WUTKE, E.B.; TAMISO, L.G. **O papel das leguminosas para adubação verde em sistemas orgânicos.** In: Curso regional de agricultura orgânica/adubação verde para agricultura orgânica. Piracicaba-SP, p17-76, 2000.

ANDREOLA, F.; PANDOLFO, C.M.; TESTA, V.M., WILDNER, L. do P. Efeito da cobertura vegetal de inverno e da adubação sobre o rendimento de grãos de feijão e de milho. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 1, 1998. Chapecó, SC. **Resumos....** Chapecó: EPAGRI, 1998a. p.116-121

ANDREOLA, F.; WILDNER, L. do P.; TESTA, V.M. Efeito da mucuna e da adubação sobre o rendimento de grãos de milho. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 1, 1998. Chapecó, SC. **Resumos...** Chapecó: EPAGRI, 1998b. p. 111-115.

ANDREOLA, F. Efeito do consórcio de espécies de inverno para cobertura do solo sobre o rendimento de milho e de feijão. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 3, 2001. Chapecó, SC. **Resumos...** Chapecó: EPAGRI-CPPP, 2001. p. 313-317.

ANGHINONI, I. & SALET, R.L. Amostragem do solo e as recomendações de adubação e calagem no sistema plantio direto. Por: NERNBERG, N.J. **Conceitos e fundamentos do sistema plantio direto**. Lages, SC: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul, 1998. p.27-52.

ARSHAD, M.A.; SCHINITZER, M.; ANGERS, D.A.; RIPMEESTER, J.A. Effects of till vs no-till on the quality of soil organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v.22, p.595-599, 1990.

BALDISSERA, I.T. & SCHERER, E.H. Efeito da mucuna e da adubação nitrogenada na cultura do milho em Latossolo Roxo distrófico (LRd). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE ADUBAÇÃO VERDE E ROTAÇÃO DE CULTURAS, 3. Cascavel, PR. **Resumos...**, OCEPAR, 1991. p. 129.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. ANDRADE, D.S. & HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solo sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.4, p. 641-649, 1998.

CALEGARI, A. Efeito dos resíduos de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* L.) no rendimento do milho. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE ADUBAÇÃO VERDE E ROTAÇÃO DE CULTURAS, 3. Cascavel, PR. **Resumos...**, OCEPAR, 1991. p. 127.

CAMPOS, B.C.; HUNGRIA, M. & TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> por estirpes de *Bradyrhizobium* no solo em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, n.3, p.583-592, 2001.

CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. **Microbiologia do solo** Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função das variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.133-142, 1990.

COSTA, M.B.B.; CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BOLISANI, E.A.; WILDNER, L.P.; MIYASAKA, S. & AMADO, T.J.C. **Adubação verde no sul do Brasil**. AS-PTA, RJ, 1992. 347p.

DAROLT, M.R. As dimensões da sustentabilidade: um estudo da agricultura orgânica na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Curitiba, 2000, 310p. (Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná).

DE-POLLI, H. & CHADA, S.S. Adubação verde incorporada ou em cobertura na produção do milho em solo de baixo potencial de produtividade. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v. 13, p. 287-293, 1989.

DERPSCH, R.; SEDIRAS, N. & HEINZMANN, F.X. Manejo do solo com coberturas verdes de inverno. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.20, p.761-773, 1985.

DORAN, J.W. Microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, v.44. p.764-771. 1980.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma**. 2 ed. Guaíba: Agropecuária, 1999. 157p.

FERNANDES, S.A.P. **Avaliação de parâmetros químicos e biológicos em diferentes sistemas de manejo do solo**. Piracicaba, 1995, 98p. (Mestrado – Esalq/Universidade de São Paulo).

FERRO, M. Efeito residual de diferentes espécies de adubos verdes de inverno sobre o rendimento de soja e milho. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE ADUBAÇÃO VERDE E ROTAÇÃO DE CULTURAS, 3. Cascavel, PR. **Resumos...**, OCEPAR, 1991. p.126.

FOLLET, R.F. & SCHIMMEL, D.S. Effect of tillage practices on microbial biomass dynamics. **Soil Science Society of America Journal**, v.53, n.4, p.1091-1096, 1989.

FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. dos; VOSS, M. & AMBROSI, I. Rendimento de soja em diferentes rotações de espécies anuais de inverno sob plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.2, p.349-355, 2000.

FRANZLUEBBERS, A.J.; HONS, F.M.; ZUBERER, D.A. Long-term changes in soil carbon and nitrogen pools in wheat management systems. **Soil Science Society of America Journal**, v.58, p. 1639-1645, 1994.

FUNDAÇÃO CARGILL **Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas no Estado de São Paulo**. Campinas, 1984, 138p.

GALLO, P.B.; SAWAZAKI, E.; HIROCE, R. & MASCARENHAS, H.A.A. Produção de milho afetada pelo nitrogênio mineral e cultivos anteriores com soja. **Revista brasileira Ciência Solo**, v.7, p.149-153, 1983.

GASSEN, D., GASSEN, F. **Plantio direto – o caminho do futuro**. Ed. Aldeia Sul, Passo Fundo, 1996. 207p.

HILEMAN, B. **Agricultura alternativa nos EEUU**. Trad. Dora S. Cerutti. Rio de Janeiro: AS-PTA. Textos para debate, n.30. 70p. 1990.

HOLTZ, G.P.; SÁ, J.C. Resíduos culturais: reciclagem de nutrientes e impacto na fertilidade do solo. In: Curso sobre manejo do solo no sistema de plantio direto. **Anais**. Fundação ABC, Castro, Paraná. p.21-36, 1995.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, n° 56, 1997, p.1-9.

KANTHACK, R.A.D.; MASCARENHAS, H.A.A.; CASTRO, O.M. & TANAKA, R.T. Nitrogênio aplicado em cobertura no milho após o tremoço. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE ADUBAÇÃO VERDE E ROTAÇÃO DE CULTURAS, 3. Cascavel, PR. **Resumos...**, OCEPAR, 1991. p. 135.

KUSHWAHA, C.P.; TRIPATHO, S.K. & SINGH, K.P. Soil organic matter and water-stable aggregates under different tillages residue conditions in a tropical dryland agroecosystem. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p.229-241, 2001.

LYNCH, J.M. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure. **Pant and Soil**, v.76, n. 1-3, p. 307-318. 1984.

LYNCH, J.W. **Biotecnologia do solo**. Ed. Manole Ltda., São Paulo, 209 p. 1986.

McGONIGLE, T.P. & MILLER, M.H. Mycorrhizal development and phosphorus absorption in maize under conventional and reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, v. 7, n., p.1002-1006, 1993.

McGONIGLE, T.P. & MILLER, M.H. Mycorrhizal, phosphorus absorption and yield of maize in response to tillage. **Soil Science Society of America Journal**, v. 60, n.6, p.1856-1861, 1996.

MONEGAT, C. **Plantas de cobertura do solo - características e manejo em pequenas propriedades**. Ed. do Autor, Chapecó, SC, 1991, 333p.

OLIVEIRA, A.A.R. & SANDERS, F.E. Effect of management practices on mycorrhizal infection, growth and matter partitioning in field-grown bean. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.34, n.7, p.1247-1254, 1999.

PEACOCK, A.D.; MULLEN, M.D.; RINGELBERG, D.B.; TYLER, D.D.; HEDRICK, D.B.; GALE, P.M. & WHITE, D.C. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1011-1019. 2001.

PRIMAVESI, A. **Agroecologia: ecosfera, tecnosfera e agricultura**. São Paulo, Nobel, 1997. 199p.

RODRIGUES, F.S.O.; GODOY, L.J. & FEITOSA, C.T. Acúmulo de matéria seca e nutrientes em plantas de amendoim cultivar tatuí-76. **Revista brasileira Ciência Solo**, v.10, p.61-66, 1986.

ROSELEM, C.A. **Nutrição e adubação do feijoeiro**. POTAFOS, Piracicaba, 1987. 93p.

RUEDELL, J. **Plantio Direto na Região de Cruz Alta**. Cruz Alta: FUNDACEP-FECOTRIGO, 1995. 134p.

SÁ J.C.M. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas de manejo convencional e plantio direto**. Piracicaba, 2001, 141p. (Tese de Doutorado – Esalq/ Universidade de São Paulo).

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. **Plant physiology**. Wadsworth, Inc., 1992. 700p.

SCHOLLES, D. & VARGAS, L.K. Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral em um podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, n.1, p. 35-42, 2000.

SCHOLLES, D.; KOLLING, J. & SELBACH, P.A. Resposta da soja ao nitrogênio mineral na presença e na ausência de calcário e de resteva de trigo. **Revista brasileira Ciência Solo**, v.7, p.305-309, 1983.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil - carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur and micronutrients**. John Wiley & Sons, NY, 1986. 380p.

TISDALL, J.M. & OADES, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soil. **Journal of Soil Science**, v.33, n.1, p.141-163. 1982.

# Capítulo 3

## Micorrizas Arbusculares em Plantas Tropicais: Café, Mandioca e Cana-de-açúcar

Arnaldo Colozzi **FILHO** <sup>(1)</sup> e Marco Antonio **NOGUEIRA** <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

Micorrizas arbusculares são associações simbióticas mutualistas formadas entre fungos Zigomicetos da ordem Glomales (Morton & Benny, 1990) e raízes da maioria das plantas superiores. Com base na ocorrência generalizada dessa associação, Marx & Brian (1975) postularam que “plantas não possuem raízes mas sim micorrizas”. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam uma relação simbiótica com a planta, caracterizada pela penetração do micélio fúngico inter e intracelularmente às raízes, sem causar nelas modificações morfológicas. O resultado da colonização radicular pelos FMAs é a ampliação da interface de conexão entre planta e solo, promovida pelo micélio formado externamente às raízes, após o estabelecimento da simbiose. Os principais benefícios dessa relação para as plantas são a ocorrência de alterações metabólicas diversas, com reflexos positivos sobre seu desenvolvimento e estado nutricional. Plantas micorrizadas apresentam maior atividade fotossintética, maior atividade enzimática e de produção de substâncias reguladoras de crescimento. Essas alterações metabólicas conferem às plantas maior resistência aos efeitos provocados por estresses de natureza biótica (pragas e doenças) ou abiótica (déficits hídricos e nutricionais ou estresses térmicos). Ecologicamente, a micorrização possibilita melhor utilização e conservação dos nutrientes disponíveis no sistema solo-planta, por possibilitar às plantas melhor adaptação ao ecossistema, bem como a maior capacidade de adaptação de mudas transplantadas.

Os efeitos da micorrização são atribuídos, principalmente, ao desenvolvimento extrarradicular do micélio, que acontece após a colonização radicular pelo fungo.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisador - Instituto Agronômico do Paraná, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375, Três Marcos, Caixa Postal – 481, CEP - 86001-970, Londrina, PR. E-mail: acolozzi@iapar.br.

<sup>(2)</sup> Professor - Universidade Estadual de Londrina; CCB/Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana. Caixa Postal 6001, CEP - 86051-990, Londrina, PR. E-mail: nogueira@uel.br

O micélio externo conecta raízes e solo ou mesmo raízes de diferentes plantas ou espécies vegetais, estabelecendo ligações múltiplas que ocasionam nova dinâmica na aquisição de nutrientes pelas plantas, com reflexos sobre a reciclagem de nutrientes e até mesmo sobre propriedades físicas do solo (Bethlenfalvay, 1992). Bethlenfalvay & Linderman (1992) atribuem aos FMAs o papel de “mediadores” na troca de nutrientes entre componentes do sistema solo-planta, estabelecendo uma rede entre eles e também atuando em estreita interrelação de causa e efeito na troca de nutrientes minerais, compostos de C e sinais moleculares entre a planta e a comunidade de microrganismos da rizosfera.

Do ponto de vista agrônomo, o maior desenvolvimento e produtividade das plantas micorrizadas é o efeito mais importante. Plantas colonizadas por FMAs têm seus requerimentos nutricionais reduzidos à metade ou até a 1/10 quando comparadas àquelas não micorrizadas (Siqueira & Franco, 1988). Esses efeitos são mais acentuados para nutrientes que possuem baixa mobilidade no solo, como P, Zn e Cu, para a maioria das plantas, e N para as leguminosas. Nesse caso, embora as micorrizas não possuam a habilidade de fixar N atmosférico, elas favorecem a nodulação e fixação biológica do N, principalmente em condições sub-ótimas de P (Pacovsky, 1989), por promoverem maior absorção desse nutriente. O favorecimento na absorção de nutrientes pelas raízes resulta, principalmente, do aumento da área de superfície das raízes micorrizadas, que podem conter até 1,5 m de hifa em cada cm de raiz colonizada. As hifas espalham-se no solo e, quando a difusão é limitante, como no caso do P, podem representar aumentos de 10 a 60 vezes na superfície e na taxa de absorção do nutriente, respectivamente (Siqueira et al., 1988). Desse modo, a utilização dos nutrientes da solução do solo, mineralizado ou fornecido via fertilização, será aumentada e o requerimento de fertilizantes será reduzido na mesma proporção (Silveira, 1992).

Nas regiões tropicais, embora existam condições favoráveis de luz e temperatura para o desenvolvimento das plantas, existem áreas que apresentam sérias restrições aos cultivos comerciais, por apresentarem baixa pluviosidade e solos com elevada acidez e de baixa fertilidade. Na região do Cerrado Brasileiro, importante área de cultivo do cafeeiro (*Coffea arabica*), da mandioca (*Manihot esculenta*) e da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), a ocorrência de condições adversas é freqüente, e podem ser simultâneas, dificultando o cultivo. Nessas áreas, principalmente, a micorrização é importante porque ajuda a diminuir a pressão negativa do ambiente desfavorável sobre as plantas.

Aprender a manejar os FMAs, visando aumentar sua eficiência simbiótica, pode ser significativo para a obtenção de cultivos produtivos, tanto em áreas de solos férteis quanto em áreas que apresentam baixa aptidão aos cultivos comerciais.

## 2. Micorrizas Arbusculares no Cafeeiro

As micorrizas são de ocorrência generalizada no cafeeiro, sendo observadas naturalmente colonizando as raízes desde a fase inicial de formação de mudas em viveiros (Cardoso, 1978), até em plantas adultas no campo (Lopes et al., 1983a; Cardoso et al., 2003; Siqueira et al., 1998). A simbiose micorrízica é particularmente



importante para o cafeeiro porque essas plantas, além de apresentarem elevada dependência à micorrização na fase de mudas (Siqueira & Colozzi Filho, 1986), são plantas perenes e cultivadas em monocultivo por vários anos, invariavelmente em solos de cerrado que apresentam alguma restrição ao cultivo. Segundo Johnson et al. (1992), os monocultivos prolongados selecionam espécies de FMAs mais adaptadas ao meio, mas geralmente menos eficientes em promover os benefícios da micorrização.

No Brasil, os estudos envolvendo infectividade e eficiência simbiótica de FMAs no cafeeiro têm sido realizados com mudas e mostram que espécies de FMAs eficientes geralmente são exóticas e, por isso, apresentam dificuldade de permanência no campo, depois do transplântio, provavelmente por não se adaptarem às novas condições edafoclimáticas (Lopes et al., 1983a). Em um estudo realizado em Minas Gerais, Siqueira et al. (1998) observaram que plantas pré-colonizadas em viveiros com fungos micorrízicos apresentaram maior produtividade no primeiro ano após o transplântio. Entretanto, apenas um isolado de *Glomus etunicatum* e a combinação de um isolado de *Glomus clarum* e *Gigaspora margarita* resultaram em produtividade acumulada da cultura superior à da plantas que não foram pré-colonizadas, após seis anos de produção. Os autores atribuíram esse efeito à colonização das plantas por fungos micorrízicos nativos e também à menor exigência de P pelas plantas mais velhas. No Brasil existe uma grande diversidade de fungos nativos colonizando o cafeeiro a campo, o que deve ser mantido (Siqueira et al., 1987; Oliveira et al., 1990), de forma a contribuir não apenas para a melhor nutrição da planta, mas também por outros benefícios inerentes à simbiose micorrízica. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), na rizosfera do cafeeiro já foram identificadas 45 espécies de FMAs, sendo 12 de *Acaulospora*, 17 de *Glomus*, 6 de *Scutellospora*, 4 de *Gigaspora*, 4 de *Sclerocystis* e 2 de *Entrophospora*. Entretanto, a frequência de ocorrência é maior para espécies do gênero *Acaulospora*, seguido de *Glomus*. Segundo os autores, a menor frequência de ocorrência foi observada para espécies do gênero *Gigaspora*. Fernandes (1987) cita *A. scrobiculata*, *A. morrowiae* e *A. mellea* como as espécies dominantes em cafeeiros do Sul de Minas Gerais, com índice de ocorrência maior que 50%. Nesse mesmo estudo, os autores relatam a ocorrência de baixa densidade relativa de esporos de *G. margarita* e *G. etunicatum* nas populações de fungos nativos. Essas espécies, principalmente *G. margarita*, são citadas como eficientes em aumentar o crescimento de mudas de cafeeiro (Lopes et al., 1983b; Colozzi Filho et al., 1985; Antunes et al., 1988). Recentemente, Tristão et al. (2006) confirmaram a eficiência de *G. margarita* em promover maior crescimento de mudas de cafeeiro, empregando substrato convencional (solo + esterco de curral) e outro comercial a base de casca de pinus (Vida Verde com adubação). Balota & Lopes (1996a), estudando a persistência de *G. margarita* no solo seis anos após inoculação e plantio das mudas, observaram que essa espécie ainda se encontrava presente na área e influenciava a composição da comunidade de FMAs nativos. Segundo os autores, a competição por produtos fotossintetizados ou mesmo por espaço na raiz influencia a composição da comunidade de fungos nativos no solo. Além disso, espécies menos sensíveis a fatores edáficos supressivos, como acidez, metais tóxicos e hiperparasitas, são favorecidas e podem predominar na rizosfera. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), é difícil correlacionar características gerais de solo com ocorrência de espécies, número de esporos e colonização micorrízica.

Entretanto, os autores citam a existência de tendências como o favorecimento da elevação na matéria orgânica do solo sobre a ocorrência de *A. morrowiae* e *E. colombiana* e o desfavorecimento sobre *A. scrobiculata*. Em relação ao pH, os autores citam maior ocorrência de *A. morrowiae*, *A. mellea* e *E. colombiana* em pH baixo e *A. scrobiculata* e *G. etunicatum* em pH mais elevado.

A esporulação no solo também é bastante variada e depende do fungo, da planta, de fatores de solo, da sazonalidade ou ainda de práticas de manejo da cultura (Cardoso et al., 2003). Balota & Lopes (1996a), estudando a micorrização em cafeeiros adultos em São Paulo, observaram efeito significativo positivo da adubação fosfatada com fosfato natural sobre a esporulação dos fungos nativos no solo. Os autores atribuíram esse efeito ao melhor aproveitamento do fosfato natural pelo fungo para a produção de esporos. Nesse mesmo estudo, observou-se esporulação crescente a partir de março, atingindo o máximo em outubro, sendo esse efeito associado às variações na temperatura e na precipitação pluvial (Balota & Lopes, 1996b). A disponibilidade de P também influencia, além da colonização radicular, o número de esporos, que geralmente diminui com o aumento da disponibilidade de P no solo (Siqueira et al., 1998). Além de fatores do solo e da planta, a esporulação pode ser afetada pela presença de predadores de esporos que crescem na rizosfera (Ross & Daniel, 1982) mas não existem dados observados especificamente no cafeeiro a campo. Em cafeeiro cultivado na Zona da Mata de Minas Gerais, o cultivo em sistema agroflorestal resultou em menor produção de esporos de fungos micorrízicos na camada superficial e aumento da ocorrência de esporos nas camadas mais profundas, o inverso do que ocorreu no sistema convencional de produção (Oliveira et al., 2003). A maior ocorrência de esporos em maiores profundidades no sistema agroflorestal foi atribuída à maior ocorrência de raízes.

Em cafeeiros adultos, em condições de campo, a colonização micorrízica apresenta valores bastante variados. Nos diversos trabalhos que citam dados de colonização a campo podem ser observados valores de 4% (Lopes et al., 1983a) a 80% (Oliveira, 1988). É evidente que uma das causas de variações tão grandes é inerente às condições de obtenção dos dados, que são diferentes. Entretanto, até no mesmo experimento, Saggin Júnior & Siqueira (1996) citam que em situações de campo é difícil correlacionar fatores edáficos com colonização radicular, porque existe um grande número de complexas interações envolvidas. Entretanto, algumas tendências são observadas como, por exemplo, aquelas citadas por Fernandes & Siqueira (1989) que relatam que a adubação fosfatada do cafeeiro pode causar uma redução na colonização a campo ou exercer nenhuma influência, dependendo da quantidade de P utilizada, frequência de aplicação e nível original de P no solo. Calagem, idade da lavoura, variação sazonal e local também influenciam a colonização. Segundo Siqueira et al. (1990), a calagem favorece a colonização por eliminar fatores fungistáticos que atuam sobre a germinação de esporos no solo, além de atuar sobre a composição das populações de FMAs. Segundo Saggin Júnior & Siqueira (1996), a idade da lavoura pode afetar positiva ou negativamente a colonização radicular, estando este efeito associado à sustentabilidade da lavoura. Os autores comentam dados de colonização observados em lavouras adultas na Colômbia e em São Paulo. Na Colômbia, o cafeeiro adulto apresentou colonização maior, podendo tal fato estar

relacionado ao sombreamento das lavouras. Esse manejo estaria favorecendo a colonização das plantas por FMAs e promovendo maior sustentabilidade do agrossistema cafeeiro em relação ao cultivo convencional praticado em São Paulo.

As relações da colonização micorrízica a campo com as características edáficas são de difícil interpretação, mas a comparação de dados de diversos experimentos de campo mostra que ela está mais relacionada às diferenças na composição de espécies e na quantidade de fungos nativos do que nas características do solo (Saggin Júnior & Siqueira, 1996).

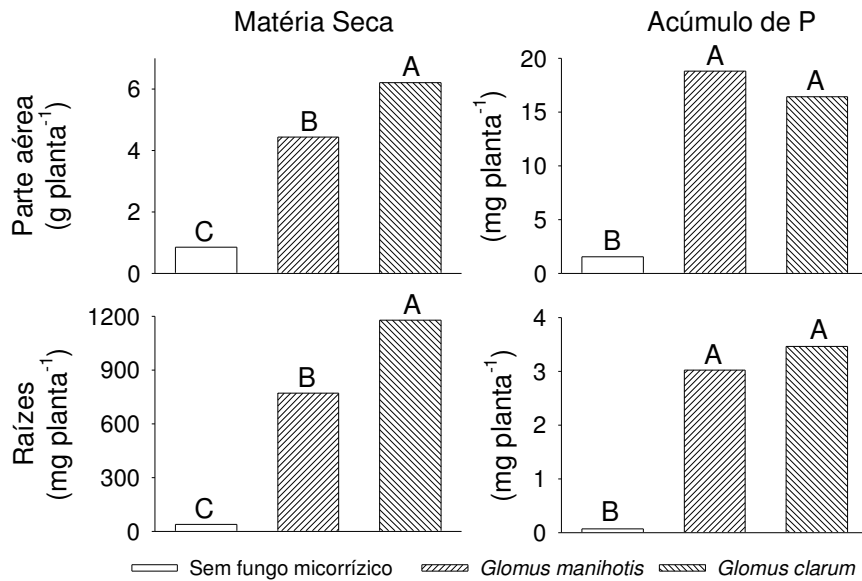
Portanto, o entendimento dessas relações a campo depende de estudos específicos que envolvam o conhecimento das espécies nativas, sua frequência de ocorrência e, principalmente, suas relações com o hospedeiro, dentro do próprio ambiente natural de cultivo e o manejo praticado na condução da lavoura.

### 3. Micorrizas Arbusculares em Mandioca

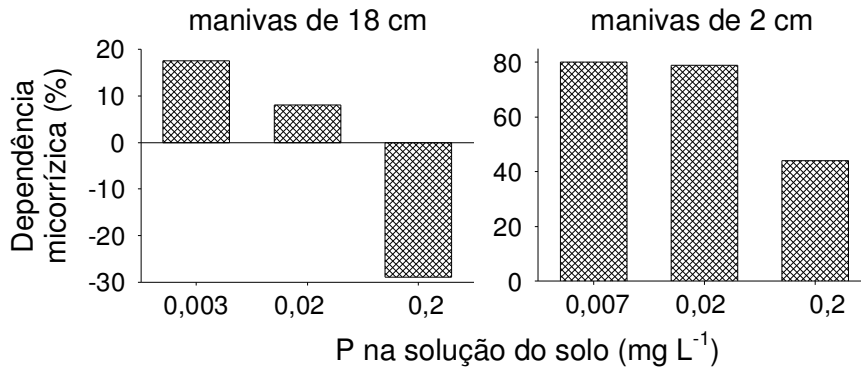
A cultura da mandioca freqüentemente ocupa solos de baixa fertilidade, porém, mesmo nessas condições, obtém níveis de produtividade considerados razoáveis. Depois da cana-de-açúcar, é a cultura que mais produz calorías por área cultivada e, por isso, é considerada como uma das mais eficientes em produzir carboidratos (Howeler, 1981).

O sistema radicular da planta de mandioca é composto por raízes grossas, pouco abundantes, com poucos pêlos, o que resulta em menor superfície específica disponível para absorção de água e nutrientes. Isso parece ser uma contradição frente à sua capacidade de adaptação a solos de baixa fertilidade. Essa característica explicita a importância das associações micorrízicas para a cultura da mandioca, pois desempenham papel importante no seu estabelecimento e manutenção, o que é comprovado pela sua alta dependência micorrízica (Figura 1) (Balota et al., 1997).

A associação das raízes das plantas a fungos micorrízicos resulta na formação da micorriza propriamente dita, a qual tem maior capacidade de exploração do solo ao seu redor com relação à obtenção de água e nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo, como o P (Figura 1), quando comparada ao sistema radicular não colonizado. Dentre os nutrientes, o fósforo é o mais importante na regulação do estabelecimento e desempenho da micorriza. Trabalhos realizados por Habte & Byappanahalli (1994) indicaram que plantas de mandioca propagadas com manivas pequenas (2 cm, contendo 2 mg de P) apresentaram maior dependência micorrízica que plantas propagadas a partir de manivas grandes (18 cm, contendo 20 mg de P). Assim, manivas maiores resultam em menor dependência da obtenção de P do solo pelas plantas via hifas externas dos fungos micorrízicos, pelo menos até quando as manivas puderem suprir o P necessário ao desenvolvimento da planta, o que ocorre nas fases iniciais. Além disso, sob alta disponibilidade de P no solo, houve efeito micorrízico negativo, ou seja, depressão de crescimento da planta com 103 dias, em relação àquelas não micorrizadas (Figura 2). Nessa condição, o fungo passa a constituir um gasto a mais para a planta, sem que esta seja beneficiada pelo aumento da absorção de P, que já se encontra em quantidade suficiente.



**Figura 1.** Produção de matéria seca da parte aérea e raízes e acúmulo de P por plantas de mandioca colonizadas ou não por fungos micorrízicos arbusculares. Os valores representam a média dos tratamentos com bactérias diazotróficas. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. (Adaptado de Balota et al., 1997).



**Figura 2.** Dependência micorrízica de plantas de mandioca em função do tamanho da maniva e da disponibilidade de P na solução do solo. (Adaptado de Habte & Byappanahalli, 1994).

Avaliações de plantas micorrizadas nas fases iniciais de seu ciclo de desenvolvimento não expressam exatamente o que pode ocorrer com a planta ao final de seu ciclo produtivo. A formação de micorriza é um processo às vezes lento, que demanda energia da planta destinada à formação da biomassa fúngica. Nessa fase, pode inclusive haver depressão de crescimento da planta hospedeira, pois os

benefícios da simbiose ainda não foram alcançados. Assim, é importante avaliar as plantas numa fase em que possam ter tido tempo hábil para se beneficiar da simbiose. Fagbola et al. (1998a) observaram aumentos da produção de raízes de mandioca em condições de campo, quando inoculadas com *Glomus clarum*, apenas aos 9 e 12 meses após o plantio, sendo que as avaliações iniciais não revelaram efeitos positivos da inoculação com o FMA.

Incrementos na produção de matéria seca e absorção de P de três e sete vezes, respectivamente, foram observados quando plantas de mandioca cultivadas em solo com baixa disponibilidade de P foram micorrizadas (Howeler et al., 1987). A presença de micorriza também diminuiu drasticamente o nível crítico de P disponível no solo (extrator Bray II) para a obtenção de 95% da capacidade produtiva máxima dessa cultura, o qual foi de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  para as plantas micorrizadas e de  $190 \text{ mg kg}^{-1}$  para as não micorrizadas (Howeler et al., 1982). Nesse caso, o fungo micorrízico fez o papel de  $175 \text{ mg kg}^{-1}$  de P, o que é importante na maioria dos sistemas de produção de mandioca, que não empregam fertilizantes químicos. A drástica redução da necessidade de fertilizantes fosfatados de plantas de mandioca associadas a fungos micorrízicos eficientes também foi relatada por Sieverding & Howeler (1985).

Balota et al. (1997) observaram aumentos de produção de mais de seis vezes na parte aérea e de mais de trinta vezes nas raízes de plantas colonizadas por *Glomus clarum*, cultivadas em solo com  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  de P disponível (Mehlich), em comparação com a planta não micorrizada. Os autores chamaram a atenção para o fato de que mesmo espécies de diferentes origens podem diferir quanto a sua capacidade de propiciar maior desenvolvimento de seu hospedeiro. De forma contrária ao observado por Howeler et al. (1987), que descreveram a inoculação com *Entrophospora colombiana* como altamente eficiente em promover o crescimento de plantas de mandioca, Azcón-Aguilar et al. (1997) observaram que a inoculação dessa espécie micorrízica não resultou em colonização radicular e, conseqüentemente, não houve benefícios às plantas em termos de aumentos de massa de matéria seca de parte aérea e raízes. Essa falta de colonização foi atribuída ao fato de que as plantas receberam o inóculo do FMA quando já estavam aclimatadas. Já a inoculação com *G. clarum* propiciou maior crescimento das plantas em relação ao controle não micorrizado em uma das variedades, mas não em outra, apesar de ter alcançado o maior nível de colonização radicular entre as espécies de FMA avaliadas. Kato et al. (1990) observaram que diferentes espécies de FMA atingiram diferentes níveis de colonização radicular em plantas de mandioca. As espécies que propiciaram maior desenvolvimento das plantas também propiciaram maior colonização radicular, o que esteve positivamente correlacionado com os teores de P nos tecidos das plantas. Nesse caso, das nove espécies de FMA testadas, as que mais se destacaram foram *Glomus clarum* e *Acaulospora appendicula*. Uma mistura contendo todas as nove espécies de FMA mostrou-se igualmente eficiente em aumentar a produtividade da cultura, provavelmente devido à presença das duas espécies eficientes. Sob esse aspecto, o uso de uma mistura de espécies pode aumentar as chances de que uma interação eficiente seja alcançada. Isso pode facilitar programas de inoculação, sem que haja necessidade de seleção apenas de espécies reconhecidamente eficientes.

Num experimento que avaliou a eficiência de um inóculo puro de *Glomus manihotis* e *Entrophospora colombiana*, reconhecidamente eficientes em promover o desenvolvimento da planta de mandioca nas condições avaliadas, ou a mistura destes com *G. occultum*, reconhecidamente ineficiente, Sieverding (1989b) observou que a inoculação com as espécies eficientes, mesmo em mistura com até 50% da ineficiente, resultou em desenvolvimento da planta e absorção de P semelhantes aos das plantas colonizadas pelos inóculos eficientes puros.

Em condições de campo, Balota et al. (1999) encontraram níveis de colonização micorrízica em mandioca que variaram de 31 a 71%, sendo os valores mais baixos encontrados em plantas cultivadas em solos mais férteis, com maior disponibilidade de P, o que evidencia o papel desse nutriente nos mecanismos de regulação de formação da micorriza. As espécies associadas a essas plantas foram predominantemente dos gêneros *Entrophospora*, *Acaulospora*, *Scutellospora* e *Glomus*. Também em condições naturais, De Souza et al. (1999) observaram colonização micorrízica média de 57 %. Após ter feito uma avaliação quantitativa e qualitativa da ocorrência de esporos de fungos micorrízicos no solo antes e após o cultivo da mandioca, os autores constataram a diminuição da frequência relativa de ocorrência de espécies dos gêneros *Glomus*, *Gigaspora* e *Scutellospora*, enquanto houve aumento na ocorrência de *Acaulospora*, principalmente *A. scrobiculata*. Sieverding (1989a) constatou que cultivos sucessivos de mandioca favoreceram a ocorrência de *Acaulospora* spp., porém esse aumento foi relacionado com a diminuição da produtividade da cultura. Nesse caso, o cultivo sucessivo provavelmente selecionou espécies com baixa eficiência simbiótica. Atayese et al. (1993) atribuíram a maior produtividade de mandioca cultivada no sopé de uma encosta, em comparação com as plantas cultivadas no topo, à maior densidade de esporos de FMAs encontrada no primeiro local, fato que também se correlacionou com o maior nível de colonização radicular.

Apesar de existir uma grande variedade de espécies de fungos micorrízicos associados às raízes em condições naturais, apenas algumas se revelam eficientes em promover o crescimento das plantas. Howeler et al. (1987) avaliaram a eficiência de 150 isolados de fungos micorrízicos obtidos de condições naturais, dos quais apenas 60 propiciaram aumento da absorção de P e crescimento das plantas, quando avaliados isoladamente. Essas diferenças de eficiência podem ser encontradas mesmo entre isolados da mesma espécie, provenientes de diferentes locais, mas suas causas ainda não são conhecidas; possivelmente estão relacionadas com o ambiente de onde cada qual foi isolado (Balota et al., 1999). Essas observações ressaltam a necessidade de uma pré-seleção das interações mais eficientes em promover o desenvolvimento do hospedeiro, uma vez que, apesar de não haver especificidade para o estabelecimento da micorriza, ocorre certa compatibilidade funcional entre fungo e hospedeiro, modulada pelo ambiente (Cardoso et al., 1986). A inoculação de mandioca com espécies de FMA previamente selecionadas quanto a sua eficiência pode aumentar a produtividade da cultura mesmo em condições de campo em que a micorrização por espécies nativas também ocorre. Fagbola et al. (1998a) observaram respostas positivas da inoculação com *Glomus clarum*, o que aumentou a colonização micorrízica de pouco mais de 23% obtida nos locais apenas com FMAs nativos para mais de 50% nas plantas que receberam inóculo. Esse aumento de colonização

radicular pela espécie de FMA eficiente aumentou a produtividade da cultura na avaliação realizada com 12 meses. Esses resultados ressaltam a importância de sistemas de manejo que visem aumentar o potencial de inóculo de espécies eficientes em promover o desenvolvimento das plantas. Em outro trabalho, Fagbola et al. (1998b) observaram colonização radicular e produção de raízes de mandioca de pelo menos duas vezes maiores em plantas colonizadas por *Glomus clarum* do que as colonizadas por FMAs nativos, em um solo de baixa fertilidade da Nigéria. Resultados semelhantes também foram observados por Osonubi et al. (1995), em plantas a campo colonizadas por *Glomus deserticola*. Sob as mesmas concentrações de nutrientes no solo, as plantas que receberam inóculo de FMAs eficientes foram mais produtivas, o que demonstra o benefício da inoculação de espécies de fungos previamente reconhecidos como eficientes em aumentar o desenvolvimento das plantas de mandioca. A micorrização de plantas de mandioca com espécies eficientes ou o uso de práticas culturais que aumentem o potencial de inóculo de FMAs podem aumentar os efeitos positivos das associações micorrízicas em mandioca, mesmo em solos considerados marginais quanto à disponibilidade de fósforo (Atayese et al., 1993). Sob esse ponto de vista, espécies eficientes poderiam ser multiplicadas em canteiros a campo, em plantas hospedeiras, mas há que se considerar a qualidade fitossanitária do inóculo para que não seja um fator de disseminação de patógenos como fitonematóides (Balota & Colozzi-Filho, 2002).

Além do efeito direto do aumento de produtividade da cultura de mandioca pela inoculação de FMAs eficientes a campo, sem eliminação dos FMAs nativos, há também o efeito “residual” da inoculação. Além de observarem aumentos de produtividade de mandioca colonizada por FMA, Dodd et al. (1990a; 1990b) também constataram que a cultura da mandioca foi uma das mais eficientes em aumentar o potencial de inóculo, tanto do FMA introduzido quanto dos nativos, o que se refletiu no aumento de produtividade da cultura seguinte. Os resultados preconizam que pré-cultivos podem aumentar não apenas o número de esporos de FMAs nativos ou introduzidos, mas criar uma população diferenciada dependendo da cultura utilizada, como aconteceu com *G. manihotis* nas áreas cultivadas com mandioca.

Outro aspecto interessante da associação micorrízica com a mandioca refere-se ao sinergismo existente entre fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas. A inoculação de bactérias como *Klebsiella* sp., um isolado (bactéria E) homólogo a *Burkholderia* e *Azospirillum lipoferum* resultou em aumento do acúmulo de N na parte aérea das plantas micorrizadas em cerca de oito vezes em comparação com as plantas-controle não micorrizadas (Balota et al., 1997) (Tabela 1). Esse significativo aumento do acúmulo de N pelas plantas micorrizadas é atribuível à melhoria da nutrição com relação ao P, uma vez que a fixação biológica de N (FBN) requer grande consumo de energia na forma de ATP. Outros elementos-chave na FBN como o Fe e o Mo também têm suas absorções aumentadas nas plantas micorrizadas (Hayman, 1983). A presença de algumas dessas bactérias diazotróficas também incrementou a colonização micorrízica em mandioca, comparando-se com o nível de colonização atingido pelo fungo sem a presença das bactérias (Balota et al., 1995). Substâncias produzidas por bactérias podem estimular o desenvolvimento do micélio fúngico e sua ramificação, o que pode aumentar o número de pontos de infecção no hospedeiro (Aboul-Nasr, 1996).

Essa simbiose tripartite é estratégica para essa cultura, visto que dois dos macronutrientes primários têm sua absorção incrementada, o que é de fundamental importância principalmente em sistemas agrícolas de baixa utilização de insumos, como é a maioria dos casos de cultivo da mandioca.

**Tabela 1.** Acúmulo de N ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) na parte aérea de mandioca micropropagada aos 95 dias, de acordo com a inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares (Adaptado de Balota et al., 1997).

Bactéria diazotrófica	Fungo micorrízico arbuscular		
	Sem fungo	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>
Controle	20,95aB	119,79bA	156,78aA
<i>Klebsiella</i> sp.	18,42aC	90,90bB	149,34aA
<i>Burkholderia</i> sp.	27,28aB	224,10aA	243,19aA
<i>A. lipoferum</i>	20,26aB	225,12aA	185,36aA
Mistura	25,75aB	153,42bA	199,25aA

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Programas que visam à obtenção de plantas de mandioca livres de patógenos e maior quantidade de mudas provenientes de uma determinada variedade promissora após programas de melhoramento lançam mão de técnicas de microcultivo *in vitro*. Um dos principais problemas observados com essa técnica é o baixo índice de sobrevivência das plantas micropropagadas após a fase de aclimatização, chegando a apenas 55% (Azcón-Aguilar et al., 1997). O uso de micorrizas pode aumentar a tolerância das plantas ao estresse causado pela aclimatização. Houve significativo aumento da sobrevivência de clones micropropagados, colonizados por *Glomus deserticola*, que alcançaram valores próximos a 100% de sobrevivência na fase inicial do pós *vitro*, enquanto que os não micorrizados apresentaram índice de 75% (Azcón-Aguilar et al., 1997). Efeitos benéficos da micorrização de plântulas de mandioca micropropagadas também foram observados por Calderón et al. (2000), os quais relataram que as plantas associadas a *Glomus manihotis* apresentaram significativo aumento de crescimento em relação às não micorrizadas, além de terem maior uniformidade, atribuída ao menor estresse após o transplante.

#### 4. Micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar

Diferentemente do que foi apresentado sobre mandioca, trabalhos que mostram a interação entre cana-de-açúcar e fungos micorrízicos arbusculares são mais escassos. É possível que essa menor quantidade de trabalhos avaliando a micorrização da cana-de-açúcar deva-se a características intrínsecas da cultura, tais como o ciclo longo e o grande porte, o que dificulta sua avaliação em ambientes controlados, não havendo nenhum trabalho conclusivo sobre o efeito da associação micorrízica sobre essa cultura (Reis et al., 1999).



Uma das primeiras pesquisas sobre micorrizas na cultura da cana foi um trabalho pioneiro de levantamento realizado por Dainese & Cardoso (1981), que relataram a existência da simbiose entre FMAs e essa importante cultura. Nesse trabalho foram avaliadas oito variedades de cana cultivadas no município de Piracicaba (SP), sendo que os níveis de colonização variaram de zero a 22 %, sugerindo que as variedades diferiram em sua capacidade de formar micorrizas. Os esporos encontrados foram predominantemente dos gêneros *Glomus* e *Gigaspora*. Andreola (1982) observou esporulação de fungos micorrízicos de 433 a 1620/100 mL de solo e colonização radicular variando de 3 a 45% em áreas cultivadas com cana na região de Piracicaba. Novamente constatou-se o predomínio do gênero *Glomus*, com 70-96 % das ocorrências de esporos. Esse autor não encontrou relação entre os níveis de colonização radicular e o desenvolvimento da planta, fato atribuído à alta disponibilidade de P nos solos em que foram realizadas as avaliações.

Em condições de campo em Cuba, Pablos et al. (1997) observaram que os níveis de colonização micorrízica de cana-de-açúcar foram de 27 a 77%. Esses valores variaram de acordo com a fertilidade do solo numa relação inversa, característica notória para a colonização micorrízica da maioria das culturas. Entretanto, os níveis de produtividade foram inversos aos da colonização micorrízica, indicando que, naquelas condições, as maiores produtividades não necessariamente foram relacionadas ao maior nível de colonização. É possível que essa relação inversa seja decorrente da utilização de grande quantidade de fertilizantes químicos, principalmente fosfáticos, o que inibe a colonização micorrízica (Kelly et al., 2001). Em estudo realizado na Austrália, Kelly et al. (2001) observaram pouca resposta da cultura da cana à micorrização com *Glomus clarum* quando comparada às culturas do milho e da soja, classificando-a como de baixa dependência micorrízica. Ainda assim, os autores concluíram que, quando há suficiente número de propágulos de fungos micorrízicos no solo, a adubação com fertilizante fosfático, para as condições avaliadas, só se faz necessária quando a disponibilidade de P for menor que  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $\text{H SO } 0,005 \text{ M}$ ), enquanto que na ausência de propágulos de FMA, esse nível sobe para  $47 \text{ mg kg}^{-1}$  de P. Em levantamento realizado por Reis et al. (1999) em plantios comerciais de cana no Rio de Janeiro e Pernambuco, em várias condições de solo, variedades e sistemas de manejo, concluiu-se que a não realização da queima da cultura por ocasião do corte aumentou o número de esporos de fungos micorrízicos no solo, bem como a diversidade de espécies de FMAs encontradas. O aumento da quantidade e da diversidade de espécies de FMA pode contribuir para outras culturas utilizadas em rotação por ocasião da reforma do canavial, comprovadamente mais responsivas à micorrização, especialmente a soja e o milho, conforme demonstrado por Kelly et al. (2001).

Se em condições de campo a cultura da cana caracteriza-se por apresentar baixa dependência micorrízica, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares para aumentar o índice de sobrevivência durante a aclimação e o vigor de mudas obtidas a partir da cultura de tecidos parece ser promissora. Andreola et al. (1985), empregando mini toletes de três variedades de cana com uma gema, que recebeu tratamento térmico para controle de patógenos, constaram que a micorrização promoveu maior crescimento da planta, mas a eficiência do FMA variou com a variedade.

Posteriormente, Reis et al. (1994), observaram que mudas de cana-de-açúcar obtidas também por tratamento térmico das gemas foram favorecidas pela colonização por *Glomus clarum* e *Entrophospora colombiana* (Tabela 2). Nesse caso, as mudas micorrizadas apresentaram maior índice de sobrevivência aos 60 dias, além da maior massa e altura de plantas. Os níveis de colonização radicular atingiram 42% e, mesmo quando as gemas foram tratadas com fungicida triadimefon (1g/L), ainda houve colonização radicular de 22%. Apesar de a colonização ter sido reduzida à metade, ainda foram observados efeitos positivos nas mudas produzidas. Essas observações revelam o potencial que existe para o uso da micorrização na obtenção de mudas mais vigorosas, o que resultará em plantas com maior potencial de produtividade no campo. Entretanto, há necessidade de se avaliar previamente cada espécie de FMA quanto à sua capacidade de auxiliar no desenvolvimento da planta, o que depende da interação planta x fungo x ambiente. Resultados positivos da micorrização de mudas micropropagadas com *G. mosseae* e *G. manihotis* também foram constatados por Ortiz et al. (1998), em Cuba, obtendo-se plantas micorrizadas com altura 21% maior que as não micorrizadas, aos trinta dias após transplantio. Também em Cuba, resultados semelhantes foram obtidos por Soria et al. (2001), em que mudas micropropagadas de cana tiveram maior crescimento e sobrevivência quando colonizadas por fungos micorrízicos.

**Tabela 2.** Sobrevivência, matéria seca da parte aérea, altura e colonização micorrízica de mudas de cana-de-açúcar submetidas a tratamento térmico, fungicida e/ou fungos micorrízicos. (Adaptado de Reis et al., 1994).

Tratamentos	Sobrevivência	Matéria seca (g)		Altura média	Colonização
		total parcela	por planta		
	%			cm	%
Controle	50,4 b <sup>4</sup>	223,9 c	1,85 cd	44,5 b	0
Térmico <sup>1</sup>	53,3 ab	250,2 b	1,95 bc	32,8 c	0
Térmico + FMA <sup>2</sup>	57,4 a	322,5 a	2,34 a	55,0 a	42
Térmico + triadimefon <sup>3</sup>	38,3 c	156,2 e	1,7 d	18,8 d	0
Térmico + triadimefon + FMA	37,5 c	194,4 d	2,16 ab	30,2 c	22

(<sup>1</sup>) 50,5°C por duas horas; (<sup>2</sup>) *Glomus clarum* e *Entrophospora colombiana* (1,5 x 10<sup>4</sup> esporos de cada por parcela de 0,15 m<sup>2</sup>); (<sup>3</sup>) 1 g L<sup>-1</sup> em água; (<sup>4</sup>) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O efeito sinérgico entre a presença de FMA e bactérias diazotróficas também foi observado em cana-de-açúcar (Paula et al., 1991). Nesse trabalho, os autores observaram que, quando mudas micropropagadas de cana foram receberem esporos de *Glomus clarum* que continham em seu interior *Acetobacter diazotrophicus*, houve também maior colonização interna da parte aérea e das raízes por essa bactéria. De forma interessante, a colonização micorrízica aumentou na presença da bactéria diazotrófica (Tabela 3). Em levantamento de campo, Reis et al. (1999), além de *A. diazotrophicus* no tecido das plantas de cana, também constataram a presença dessa

bactéria no interior de esporos de FMA, o que pode facilitar sua entrada na planta por ocasião da colonização micorrízica também em condições de campo, comprovando o que havia sido demonstrado anteriormente nos trabalhos de Paula et al. (1991) em condições controladas.

**Tabela 3.** Colonização de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (cv SP 792312) pelo FMA *Glomus clarum* e por *Acetobacter diazotrophicus* após transplante em solo não esterilizado (Adaptado de Paula et al., 1991).

Inoculante	Colonização por FMA %	A. diazotrophicus (n° g <sup>-1</sup> peso fresco x 10 <sup>4</sup> )		
		raízes lavadas	esterilização da superfície	
			raiz	parte aérea
Controle	13,2 c	0 b	0 b	0 b
FMA	27,5 b	0 b	0 b	0 b
<i>A. diazotrophicus</i>	15,7 c	37 a	0,8 ab	0,5 b
FMA + <i>A. diazotrophicus</i>	32,6 b	40 a	1,6 a	0,1 b
FMA contendo diazotróficos internos	52,2 a	17 ab	0,1 b	3,0 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar da resposta da cana aos FMAs em condições de campo ser pouco expressiva, existe grande potencial de emprego dessa tecnologia na etapa de produção de mudas livres de patógenos, com aumentos no índice de sobrevivência das plantas e maior vigor inicial. Esse potencial poderá ser ainda maior se considerada a interação tripartite com bactérias diazotróficas, principalmente no que se refere ao uso do FMA como um veículo de auxílio à colonização dos tecidos das plantas pelas bactérias.

## Referências

- ABOUL-NASR, A. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by *Bacillus micoides* on flax. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v.41, p.261-270, 1996.
- ANDREOLA, F. Micorrizas vesiculares-arbusculares em cana de açúcar. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1982. 85 p. (Tese de Mestrado).
- ANDREOLA, F.; CARDOSO, E.J.B.N.; SILVEIRA, A.P.D. Efeito de seis espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares sobre o desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar. **STAB**, set/out, p.35-37, 1985.
- ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café. **Turrialba**, v.38, p.117-122, 1988.

ATAYESE, M.O.; AWOTOYE, O.O.; OSONUBI, O.; MULONGOY, K. Comparisons of the influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the productivity of hedgerow woody legumes and cassava at the top and the base of a hillslope in alley cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.16, p.198-204, 1993.

AZCÓN-AGUILAR, C.; CANTOS, M.; TRONCOSO, AL.; BAREA, J.M. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatation of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.72, p.63-71, 1997.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. Introdução de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo: I. Persistência e interação com espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.20, p.217-223, 1996a.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. Introdução de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo: II. Flutuação sazonal de raízes, de colonização e de fungos micorrízicos arbusculares associados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.20, p.225-232, 1996b.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.1335-1345, 1995.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.627-639, 1997.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1265-1276, 1999.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Importância de microrganismos de solo na nutrição da mandioca. In: TAKAHASHI, M.; FONSECA JR., N.S.; RORRECILLAS, S.M. (Orgs.) **Mandioca no Paraná: antes, agora e sempre**. Curitiba: IAPAR, 2002. 209 p. (Circular técnica 123).

BETHLENFALVAY, G.J. Mycorrhizae and crop productivity. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (Ed.) **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**, Madson: American Society of Agronomy, 1992. p.1-25.

BETHLENFALVAY, G.J.; LINDREMAN, R.G. **Mycorrhizae in sustainable agriculture**, Madson: American Society of Agronomy, 1992. 135p.

CALDERÓN, L.D.; GÓMEZ, L.; BLANCO, F.; URIBE, L. La inoculación con *Glomus manihotis* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de yuca producidas *in vitro*, en la fase de climatización. **Agronomía Costarricense**, v.24, p.25-29, 2000.

CARDOSO, E.J.B.N. Ocorrência de micorrizas em café. **Summa Phytopathologica**, v.4, p.136-137, 1978.

CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D.; OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citrus. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.25-30, 1986.

CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agroforestry Systems**, v.58, p.33-43, 2003.

COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em solo cultivado com cafeeiro e leguminosas de verão. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, V, Florianópolis, 1994. **Resumos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1994. p-17.

COLOZZI FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. I. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.199-205, 1986.

COLOZZI FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; GUIMARÃES, P.T.G.; OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-transplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1397-1406, 1994.

COLOZZI FILHO, A.; SOUZA, P.; OLIVEIRA, E.; CARVALHO, M.M. Desenvolvimento de mudas de cafeeiro "Catuai" micorrizadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.335, 1985.

DAINESE, M.B.; CARDOSO, E.J.B.N. Algumas observações sobre fungos endomicorrízicos em associação com cana-de-açúcar em Piracicaba, SP. **O Solo**, v.73, p.24-27, 1981.

DE SOUZA, F.A.; TRUFEM, S.F.B.; ALMEIRA, D.L.; SILVA, E.M.R.; GUERRA, J.G.M. Efeito de pré-cultivos sobre o potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares e produção de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1913-1923, 1999.

DODD, J.C.; ARIAS, I.; KOOMEN, I.; HAYMAN, D.S. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem I. The effect of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field. **Plant and Soil**, v.122, p.229-240, 1990a.

DODD, J.C.; ARIAS, I.; KOOMEN, I.; HAYMAN, D.S. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem II. The effect of pre-crops on the spore populations of native and introduced VAM-fungi. **Plant and Soil**, v.122, p.241-247, 1990b.

FAGBOLA, O.; OSONUBI, O.; MULONGOY, K. Growth of cassava cultivar TMS 30572 as affected by alley-cropping and mycorrhizal inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, p.9-14, 1998a.

FAGBOLA, O.; OSONUBI, O.; MULONGOY, K. Contribution of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and hedgerow trees to the yield and nutrient uptake of cassava in an alley-cropping system. **Journal of Agricultural Science**, v.131, p.79-85, 1998b.

FERNANDES, A.B. Micorrizas vesículo-arbusculares em cafeeiro da região sul do Estado de Minas Gerais. Lavras, 1987. 98p. Escola Superior de Agricultura de Lavras. (Dissertação de Mestrado).

FERNANDES, A.B. & SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiros da região sul do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.1489-1498, 1989.

HABTE, M.; BYAPPANAHALLI, M.N. Dependency of cassava (*Manihot sculenta* Crantz) on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v.4, p.241-245, 1994.

HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, v.61, p. 944-963, 1983.

HOWELER, R.H. The effect of mycorrhizal on the phosphorus nutrition cassava. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K.; MEHTA, Y.R. (Ed.) **The soil/root system in relation to Brazilian Agriculture**. Londrina:IAPAR, 1981. p.243-258.

HOWELER, R.H.; CADAVID, L.F.; BURCKHARDT, E. Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. **Plant and Soil**, v.69, p.327-339, 1982.

HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E.; SAIF, R.S. Practical aspects of mycorrhizal technology on tropical crops and pasture. **Plant and Soil**, v.100, p.249-283, 1987.

JOHNSON, N.C.; COPELAND, P.J.; CROOKSTON, R.K.; PFLEGER, F.L. Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. **Agronomy Journal**, v.84, p.387-390, 1992.

KATO, O.R.; OLIVEIRA, E.; SANTIAGO, A.D.; CORRÊA, H. Efeito de diferentes espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no crescimento e nutrição da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, p.117-1181, 1990.

KELLY, R.M.; EDWARDS, D.G.; THOMPSON, J.P.; MAGAREY, R.C. Responses of sugarcane, maize, and soybean to phosphorus and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.52, p.731-743, 2001.

LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, N.C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in central São Paulo State, Brazil. **Turrialba**, v.33, p.417-422, 1983a.

LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L.; MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrízicos vesicular – arbusculares. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.7, n.2, p.137-141, 1983b.

MARX, D.H.; BRYAN, W.C. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pidolium tinctorius*. **Forest Science**, v.21, p.245-254, 1975.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.

OLIVEIRA, E. Fungos endogonaceae em cafeeiros das regiões “Alto Paranaíba” e “Triângulo” em Minas Gerais. Lavras, 1988. 73p. Escola Superior de Agricultura de Lavras. (Dissertação de Mestrado).

OLIVEIRA, E.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, R.D.; COLOZZI FILHO, A.; SOUZA, P. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em cafeeiros da região do Alto Paranaíba e Triângulo no Estado de Minas Gerais. **Hoehnea**, v.17, p.117-125, 1990.

- ORTIZ, R.; DE LA FÉ, C.F.; LARA, D. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de biofertilizantes y manejo de las vitroplantas en la fase de adaptación. **Cultivos Tropicales**, v.19, p.49-53, 1998.
- OSONUBI, O.; ATAYESE, M.O.; MULONGOY, K. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on nutrient uptake and yield of alley-cropped cassava in a degraded alfisol of southwestern Nigeria. **Biology and Fertility of Soils**, v.20, p.70-76, 1995.
- PABLOS, P.; FERNÁNDEZ, P.; REYNOSA, G. Relación de hongos micorrizogenos con algunas características del cultivo de la caña de azúcar. **Caña de Azúcar**, v.15, p.77-87, 1997.
- PACOVSKY, R.S. Carbohydrate, proteins and amino-acids status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.346-354, 1989.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.111-115, 1991.
- REIS, C.H.; FIGUEIRA, A.R.; OLIVEIRA, E. Tratamento térmico, fungicida e de micorrizas vesículo-arbusculares no desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). **Fitopatologia brasileira**, v.19, p.495-498, 1994.
- REIS, V.M.; PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.34, p.1933-1941, 1999.
- ROSS, J.P. & DANIELS, B.A. Hyperparasitism of endomycorrhizal fungi. In: N.C. SCHENCK, (Ed.), **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1982. p.55-58.
- SAGGIN JUNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, 1996, p.202-254.
- SIEVERDING, E. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.29, p.369-390, 1989a.
- SIEVERDING, E. Should VAM inocula contain single or several fungal species? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.29, p.391-396, 1989b.
- SIEVERDING, E.; HOWELER, R.H. Influence of specie of VA mycorrhizal fungi on cassava yield response to phosphorus fertilization. **Plant and Soil**, v.88, p.213-221, 1985.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.207-211, 1986.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. **Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Lavras: Esal/Faepe, 1988. 236p.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J.O.; ROCHA JÚNIOR, W.F.; OLIVEIRA, E.; COLOZZI FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). **Biology and Fertility of Soils**, v.10, p.65-71, 1990.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O.J. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; SILVA, A.F. (Ed.) **Proceedings International Symposium on Environmental Stress: Maize in Perspective**. Brasil/México: EMBRAPA/CYMMYT/UNDT, 1995. p.240-280.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; FLORES-AYLAS, W.W.; GUIMARÃES, P.T.G. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. **Mycorrhiza**, v.7, p.293-300, 1998.

SORIA, A.E.M.; REYES, E.C.; OCCEQUERA, A.Z.; PEREIRA, M.C. Micorrización de plantas micropropagadas de caña-de-azúcar (*Saccharum officinarum*). **Agricultura Técnica**, v.61, p.436-443, 2001.

TRISTÃO, F.S.M.; ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. **Bragantia**, v.65, n.4, p.649-658, 2006.



# Capítulo 4

## Micorrizas em Plantas Frutíferas Tropicais

Adriana Parada Dias da **SILVEIRA** <sup>(1)</sup> e Vânia Felipe Freire **GOMES** <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

O Brasil possui condições climáticas e solos ideais ao cultivo de fruteiras tropicais, o que tem colocado o país entre os principais produtores mundiais de frutos “in natura” e de sucos. A fruticultura desperta o interesse de produtores das mais diversas regiões do país, notadamente do Nordeste e do Sudeste, onde os pomares são explorados comercialmente durante todo o ano e são responsáveis pelo abastecimento de todo o país.

A associação mutualística formada entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as raízes de fruteiras é de grande importância e interesse, devido aos benefícios causados principalmente para as plantas que passam por fase de viveiro, pois antecipa o tempo de transplantio para o campo, estimulando o crescimento precoce da muda e conseqüentemente reduzindo o seu tempo de produção, o que aumenta a produtividade do viveiro, a rotatividade na ocupação da infra-estrutura e a eficiência de utilização da mão-de-obra especializada (Silveira et al, 2003). Favorece também a tolerância aos estresses climáticos e edáficos, aumenta a resistência das plantas a patógenos, a sobrevivência das mudas ao transplantio para o campo, além de minimizar o uso e gastos com fertilizantes, uma vez que aumenta a eficiência na utilização dos nutrientes disponíveis no substrato ou dos nutrientes adicionados pela adubação (Maroneck et al., 1981). O tempo de permanência das mudas no viveiro e a sua qualidade são fatores importantes no custo de produção. Portanto, a busca de alternativas, que acarretem melhoria na qualidade sanitária do substrato e utilizem como manejo a inoculação de FMAs eficientes, pode garantir a produção de mudas saudáveis e mais precoces.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora, Instituto Agronômico, Centro de Solos e Recursos Ambientais. Caixa Postal 28, CEP- 13001-970, Campinas, SP E-mail: apdsil@iac.sp.gov.br

<sup>(2)</sup> Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências do Solo. Campus do Pici, Bloco 807, Caixa Postal 12168, CEP- 60455-760, Fortaleza, CE. E-mail: vaniafreire@ufc.br.

Em culturas que passam pela fase de mudas, como é o caso da maioria das fruteiras tropicais, a micorrização pode aumentar significativamente o desenvolvimento da planta, principalmente quando se utilizam substratos desinfestados, por vapor ou fumigação, nos quais foi eliminada a microbiota benéfica, como os FMAs, além dos patógenos. Por isso, a introdução de FMAs eficientes em viveiros de diversas fruteiras tem sido recomendado, em especial para aquelas altamente dependentes da condição micorrízica como os citros, mamão, maracujá entre outras. Apesar dos benefícios que a associação propicia, ainda há problemas quanto à produção de inóculo de FMAs em larga escala, capaz de atender à demanda dos viveiristas, o que dificulta a sua utilização como parte do manejo de produção de mudas de fruteiras (Cardoso & Lambais 1992).

Em síntese, a produção de mudas micorrizadas de plantas frutíferas deve atender a alguns requisitos como: 1- seleção de FMAs eficientes para o maior número possível de variedades da mesma espécie de planta, em determinada faixa de fertilidade do solo ou substrato, principalmente em relação ao nível de P disponível, além de ser competitivo em relação a FMAs nativos em condições de solo ou substrato não desinfestado; 2- desinfestação do solo ou substrato de forma a permitir a introdução de FMAs eficientes; 3- adequação do solo ou substrato visando um nível de fertilidade que garanta a maior expressão possível da eficiência da associação, com possível redução na quantidade de fertilizantes e aumento na eficiência de utilização dos nutrientes adicionados; 4- controle das condições ambientais em relação à umidade, temperatura e sanidade do viveiro e das mudas.

O conhecimento a respeito da associação micorrízica em plantas frutíferas tropicais é incipiente, pois somente alguns aspectos da simbiose têm sido estudados em um número ainda restrito dessas plantas. A maioria dos estudos visa avaliar o efeito da associação no desenvolvimento da planta, buscando a sua utilização prática para a produção de mudas, ou seja, explorando o aspecto biotecnológico dos FMAs.

## 2. Associação Micorrízica nas Plantas Cítricas

O Brasil é um dos maiores produtores de citros do mundo e o Estado de São Paulo produz 85% da produção brasileira de laranjas e 98% do suco exportado (Mattos Junior et al., 2005).

Entre as fruteiras, as plantas cítricas são as mais estudadas em relação à associação micorrízica, sendo que desde a década de 30 já há relatos sobre a presença de FMAs associados a raízes de diferentes plantas cítricas em pomares da Califórnia, Nova Zelândia, Austrália e Ilhas Cook (Marx et al., 1971). Na época, havia muita controvérsia sobre o papel dos fungos micorrízicos no desenvolvimento dos citros e estes autores, realizando um experimento com limão rugoso e laranja azeda e inoculação de *Glomus mosseae*, em solo esterilizado, observaram aumento no crescimento das plantas e atribuíram às raízes micorrizadas o papel de raízes "alimentadoras" das plantas. Ao mesmo tempo, com o início da prática de fumigação

de solo para produção de mudas de plantas cítricas na Califórnia e Flórida, as plantas se apresentavam cloróticas e com desenvolvimento reduzido, inicialmente atribuído ao efeito tóxico da fumigação, realizada para eliminação de patógenos. Kleinschmidt e Gerdemann (1972) realizaram, então, um experimento de inoculação de *G. mossae* em solo desinfestado por fumigação ou vapor e concluíram que o desenvolvimento insatisfatório das plantas era a nutrição inadequada em consequência da eliminação dos FMAs nativos.

Assim, na década de 70 e 80 muitos trabalhos foram realizados empregando diferentes porta-enxertos, FMAs, em várias condições de fertilidade do solo, em solo desinfestado ou não, mostrando que as plantas cítricas respondem à micorrização, havendo efeito benéfico no crescimento e na absorção de nutrientes (Schenck e Tucker, 1974; Nemeček, 1978; McGraw e Schenck, 1980 e outros). Além disso, demonstrou-se que as plantas cítricas são muito dependentes da associação micorrízica (Menge et al., 1978), resultando em um micotrofismo altamente significativo, o qual é visualizado pelo maior crescimento e melhor estado nutricional da planta.

Em pomares brasileiros, já foi constatada a presença de FMAs associados a vários porta-enxertos, em diferentes sistemas de manejo, ocorrendo, no geral, intensa colonização radicular (Oliveira et al, 1986; Weber & Oliveira, 1994; Oliveira & Coelho, 1995; França, 2004), com predominância de espécies do gênero *Glomus* (Oliveira & Coelho, 1995; Rego, 2000; França, 2004) ou *Acaulospora* (Siqueira et al., 1989; Weber & Oliveira, 1994).

Vários fatores concorrem para o estabelecimento e desempenho da micorriza, sendo que a compatibilidade entre a espécie vegetal, a espécie ou isolado do FMA e o meio de cultivo (solo ou substrato) é a mais relevante para garantir a máxima expressão de eficiência da simbiose. Assim a seleção de fungos eficientes e a adequação do substrato são dois aspectos que devem ser avaliados ao mesmo tempo. No Brasil, para várias plantas cítricas, desde a década de 80 estão sendo realizados trabalhos com este objetivo, empregando solo (Tabela 1), solo com adição de matéria orgânica ou substratos orgânicos comerciais (Tabela 2).

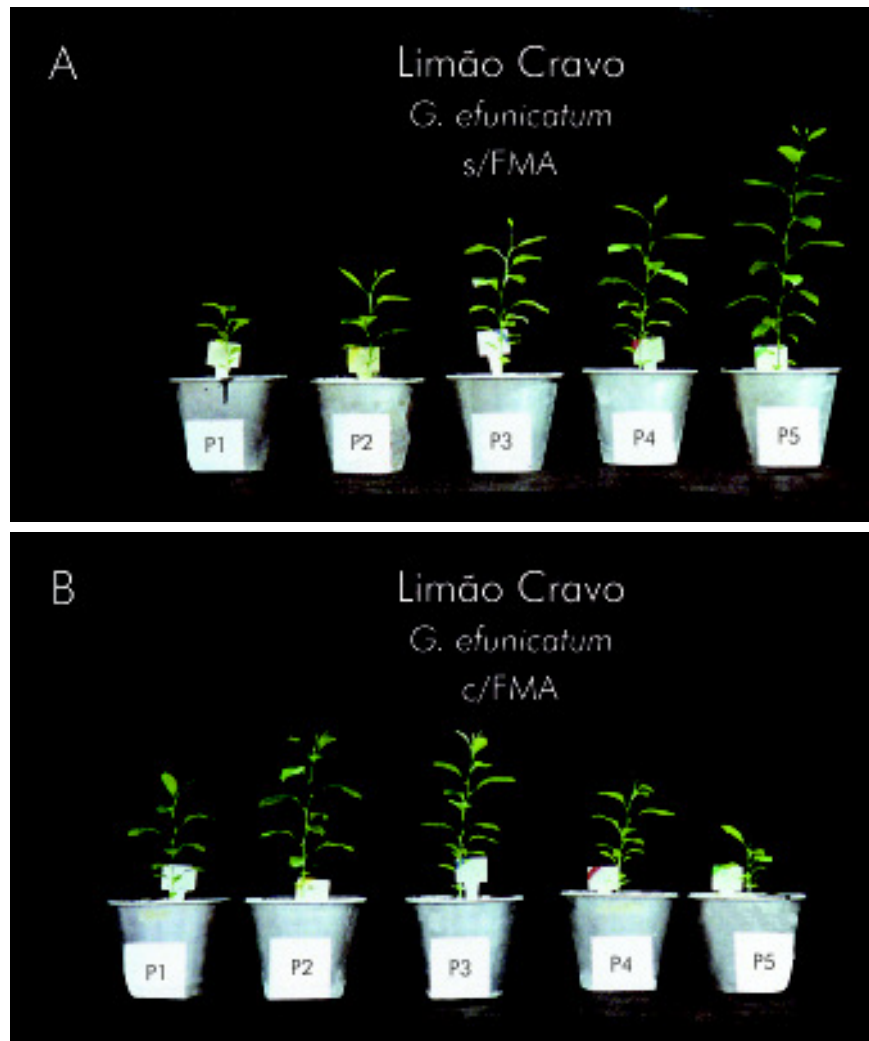
Visando atender à melhoria da qualidade das mudas cítricas, instituiu-se o “Programa de Certificação de Mudas Cítricas do Estado de São Paulo”, que estabelece normas como a obtenção de mudas em ambiente protegido, mudas envasadas, utilizando substratos e água desinfetados (Panzani et al., 1994). Além disso, há uma portaria da CDSV (Centro de defesa sanitária Vegetal) da Secretária da Agricultura do Estado de São Paulo que obriga os viveiristas de mudas de plantas cítricas a efetuarem a produção em viveiros telados (ambiente protegido), o que, conseqüentemente, leva ao uso obrigatório de substrato em recipientes, com total isenção de solo. Apesar das dificuldades para adaptação e do alto custo das instalações, esse sistema possibilita a obtenção de mudas em períodos mais curtos, além de mudas de melhor qualidade, pois há maior controle de patógenos e praga, e possibilita a inoculação de FMAs eficientes nos substratos isentos de propágulos. Este efeito é ilustrado pela figura 1, que mostra mudas de limoeiro Cravo produzidas em dois substratos orgânicos comerciais onde foram inoculados *G. etunicatum* e *G. intraradices* (Maiorano, 2003).



**Figura 1.** Mudas de limoeiro Cravo, colonizadas por *G. etunicatum* e *G. intraradices*, produzidas em substrato orgânico comercial à base de casca de pinus (Vida Verde adubado) e de fibra de coco (Golden Mix-47).

A dependência das plantas cítricas à associação micorrízica diminui com o aumento na disponibilidade de P no solo ou substrato (Figura 2), podendo resultar em depressão no crescimento da planta (Graham et al., 1997; Melloni & Cardoso, 1999). Várias hipóteses têm sido levantadas na busca de explicações para este efeito: 1- a mais aceita é a de que em condições de altos níveis de P no solo ocorre competição entre a planta e o FMA por carboidratos e o endófito age como um dreno de C, afetando o crescimento da planta (Peng et al, 1993; Sena et al., 2004)); 2- altos níveis foliares de P e K podem causar alteração no metabolismo de carboidratos na planta, provocando diminuição no seu crescimento (Antunes e Cardoso, 1991); 3- redução na colonização micorrízica sem, entretanto, alterar o micélio externo (Nogueira & Cardoso, 2006) ou diminuindo o micélio externo ativo (Gomes, 1997; Melloni & Cardoso, 1999); 4- alteração nos parâmetros cinéticos de absorção radicular de P, ocorrendo diminuição na  $V_{max}$  e aumento no  $K_m$  e  $C_{min}$  com o aumento de P disponível (Cunha, 1999).

O papel dos fitoreguladores na micorrização ainda é pouco conhecido, mas Souza et al. (2000) observaram que a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) aumentou o desenvolvimento vegetativo de citrange Carrizo colonizado por *G. intraradices*, além de os níveis foliares de P e K e as dimensões dos feixes vasculares, concluindo que a auxina favorece a associação simbiótica. Em laranja azeda, o AIB também causou aumento no crescimento das plantas, enquanto que o ácido naftalenoacético (ANA) foi ineficiente em estimular o crescimento (Souza et al., 1996).



**Figura 2.** Mudanças de limoeiro Cravo não colonizadas (A) e colonizadas (B) pelo fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum*, em função da adição de doses crescentes de P ao substrato (P1- 1,5; P2- 3,0; P3- 6,0; P4- 9,0; P5- 12,0 mg L<sup>-1</sup> de P). (Fonte: Cunha, 1999).

### 3. Associação Micorrízica em Mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta nativa da América tropical e importante comercialmente em vários países. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de mamão e o terceiro exportador.

Cultura tradicionalmente cultivada nas regiões tropicais pode apresentar limitações de ordem nutricional causadas principalmente pelo N e P (Fernandes et al., 1990), sendo necessárias adubações para solucionar tal problema. Contudo, estudos sobre a inoculação de FMAs para produção de mudas de mamoeiro têm demonstrado a eficiência dessa associação na promoção do desenvolvimento da planta.

**Tabela 1.** Alguns trabalhos realizados no Brasil com diferentes plantas cítricas e FMAs, utilizando solo ou mistura de solo-areia.

Planta	FMA eficiente	Adubação fosfática	Referência
Limão cravo	<i>G. margarita</i>	Abaixo do limite crítico	Caldeira et al., 1983
Limão cravo e Laranja caipira	<i>G. leptotichum</i> e <i>G. gilmorei</i> <i>G. margarita</i>	FR: 106 mg dm <sup>-3</sup> P total FS: 0, 30, e 100 mg kg <sup>-1</sup>	Cardoso et al., 1986
Limão cravo	FMAS nativos e <i>G. etunicatum</i>	FR e FS: 0, 50, 100 e 200 mg kg <sup>-1</sup>	Antunes e Cardoso, 1990
Limão cravo	<i>G. etunicatum</i>	FR e FS: 0, 50, 100 e 200 mg kg <sup>-1</sup>	Antunes e Cardoso, 1991
Limão cravo, Limão rugoso da Flórida e Limão rugoso da Flórida FM	<i>G. etunicatum</i>	P no solo: 6 mg dm <sup>-3</sup>	Oliveira et al., 1992
Laranja caipira e Tangerina cleópatra	<i>G. intraradices</i> e <i>G. clarum</i>	FS: 0, 50, 100, 200 e 250 mg kg <sup>-1</sup>	Melloni e Cardoso, 1999
Limão cravo	<i>G. intraradices</i>	FS: 0, 50, 100, 200 e 250 mg kg <sup>-1</sup>	Melloni et al., 2000

Fonte de P usada: FR - fosfato de rocha e FS- fosfato solúvel.

**Tabela 2.** Alguns trabalhos realizados no Brasil com diferentes plantas cítricas e FMAs, empregando substrato com incorporação de matéria orgânica.

Planta	FMA eficiente	Substrato	Referência
Limão cravo <i>G. manihotis</i> , <i>E. colombiana</i>	<i>G. albidum</i> , <i>G. clarum</i> ,	Solo-esterco bovino - 10%	Weber e Luz, 1990
Limão rugoso Flórida	<i>G. clarum</i>	Solo-composto orgânico-12,5%	
Limão cravo	<i>A. morrowae</i>	Substrato comercial e FR ou FS: 0, 320, 640 e 1280 g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> m <sup>-3</sup>	Camargo et al., 1990
Limão cravo, Limão volkameriano, Limão rugoso Flórida e Tangerina cleópatra	<i>G. etunicatum</i>	Solo-torta de mamona-esterco bovino- palha braquiária: 0, 4 e 8 t ha <sup>-1</sup>	Weber et al., 1990
Tangerina cleópatra	Mistura de FMAs	Substrato comercial (casca de pinus) e FS: 0, 320, 640, 1280, 200 e 2560 g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> m <sup>-3</sup>	Rocha et al., 1994 e 1995
Citrange Troyer	<i>G. intraradices</i>	Areia sílicea+ perlita + turfa Sphagnum e turfa negra + turfa Sphagnum	Souza et al., 1997 e 1998
Tangerina cleópatra, Sunki e Orlando; Laranja azeda; Limão cravo e volkameriano; Citrange troyer; <i>Poncirus trifoliata</i>	<i>G. clarum</i> e <i>G. intraradices</i>	Solo-areia-plantmax	Agnani et al., 1998
Citrange troyer	<i>A. scrobiculata</i>	Solo-areia e solo-areia-casca de acácia negra	Souza et al, 2003
Limão cravo	<i>G. intraradices</i> e <i>G. etunicatum</i>	Vários substratos orgânicos comerciais à base de casca de pinus e fibra de coco	Maiorano, 2003

Fonte de P usada: FR - fosfato de rocha e FS- fosfato solúvel

Desde a década de 70 já se conhece o efeito benéfico da micorrização na obtenção de mudas de mamoeiro, quando Ramirez et al. (1975) constataram que a inoculação de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora calospora* promoveu maior crescimento das plantas, em solo com pH 6,5 e esterilizado. Posteriormente, Casagrande et al. (1986) selecionaram FMAs para produção de mudas mas empregaram como substrato uma mistura de subsolo e esterco, não desinfestada, constatando que a inoculação de *Glomus mosseae* e um inóculo misto obtido na rizosfera de *Paspalum notatum* causaram maior crescimento das plantas em relação às não micorrizadas, crescidas em substrato desinfestado.

A produção de mudas de plantas frutíferas geralmente emprega no preparo do substrato a adição de esterco que, se por um lado beneficia a associação micorrízica estimulando o crescimento radicular do hospedeiro, por outro pode prejudicar o estabelecimento da micorriza pelo aumento na disponibilidade de P no substrato. Assim, Trindade et al. (2000a) concluíram que a adição de 10% de esterco bovino de curral (P - 41 mg dm<sup>-3</sup>) ao solo desinfestado por fumigação e inoculação de *Glomus etunicatum* promoveu a obtenção de mudas saudáveis e apropriadas ao transplante para o campo.

Efeitos da adubação fosfática e da inoculação de FMAs na produção de mudas de mamoeiro foram realizados em diversas condições. Weber & Amorim (1994), empregando um latossolo amarelo álico textura franco argilosa, esterilizado, constataram um grande efeito benéfico da micorrização no crescimento das plantas e acúmulo de nutrientes na parte aérea, pois as plantas não micorrizadas e adubadas com 60 mg L<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> tiveram crescimento equivalente às micorrizadas no solo não adubado (sem adição de P). *Glomus etunicatum* e *Entrophospora colombiana* favoreceram o crescimento das plantas principalmente nas doses de 20 e 40 mg L<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Silva & Siqueira (1991), empregando uma mistura de solo e vermiculita (5:1 v/v), desinfestada por fumigação e suplementada ou não com superfosfato simples (SS), observaram que as plantas obtidas em substrato sem SS (P - 2 mg dm<sup>-3</sup>) responderam à inoculação de *Glomus clarum*, *Glomus macrocarpum*, *Scutellospora heterogama* e mistura de fungos, enquanto que com a adição de SS (P - 52 mg dm<sup>-3</sup>) responderam apenas a *Glomus clarum*.

A interação entre o FMA, a planta hospedeira e o nível de P no solo/substrato depende principalmente do genótipo da planta em relação à sua exigência nutricional, capacidade de absorção e eficiência de utilização do nutriente absorvido, além do grau de dependência micorrízica (Clement e Habte, 1995; Koide, 1991). Portanto, o genótipo do hospedeiro é um fator determinante do estabelecimento da associação micorrízica, pois características relacionadas ao sistema radicular, taxa de crescimento e alocação de carboidratos exercem influência na formação da micorriza (Amijee et al., 1993). Neste aspecto, Trindade et al. (2001a) avaliaram o grau de dependência micorrízica de quatro variedades de mamoeiro em função da aplicação de P no solo (superfosfato triplo), desinfestado por fumigação, concluindo que a máxima eficiência micorrízica do mamoeiro situou-se na faixa de 12 a 16 mgdm<sup>-3</sup> de P disponível e que a alta dependência micorrízica da planta relacionou-se com a capacidade da variedade em produzir raízes.

A micorrização das variedades Baixinho de Santa Amália e Tainung n°1 por *G. clarum* e *Gigaspora margarita* reduziu em até sete vezes a necessidade de aplicação de P ao solo para se atingir a máxima produção de parte aérea, resultado de uma maior eficiência simbiótica (Tabela 3). Ao mesmo tempo, Trindade et al (2001b) determinaram o coeficiente de determinação genotípica do mamoeiro quanto à capacidade de se associar ao FMA e de ser uma associação eficiente, baseado na premissa de que as plantas, mesmo no nível de variedade, podem diferir na sua eficiência micorrízica e no seu grau de susceptibilidade à colonização micorrízica (Lackie et al., 1988), o que é importante nos programas de seleção de plantas e de FMAs para produção de mudas de plantas frutíferas. Assim, os autores concluíram que o melhoramento de mamoeiros do grupo Formosa pode modificar a produção de parte aérea, comprimento de raízes, altura de plantas e a eficiência micorrízica, enquanto que para o grupo Solo, o mais provável será colonização radicular e produção de parte aérea.

**Tabela 3.** Benefício micorrízico, eficiência simbiótica e P aplicado e disponível no solo para promover máxima eficiência micorrízica nas variedades de mamoeiro colonizadas ou não por *G. clarum* ou *G. margarita*.

Fungos	Benefício		Eficiência simbiótica	Classificação da eficiência	P aplicado	P disponível
	P	Micorrízico				
		adimensional	%	mg dm <sup>-3</sup>		
Sunrise Solo						
Controle	218,11	-	-	-	67-90 <sup>(1)</sup>	33,8-46
<i>G.clarum</i>	-	27,0	12,4	baixa	23,8	12,7
<i>G.margarita</i>	-	44,0	20,2	baixa	25,5	13,5
Sunrise Solo - Line 72/12						
Controle	224,07	-	-	-	77,8-73	39,3-36,9
<i>G.clarum</i>	-	39,6	17,7	baixa	30,5	16,0
<i>G.margarita</i>	-	27,0	12,0	baixa	27,0	14,3
Baixinho de Santa Amália						
Controle	177,6	-	-	-	110-106	57-55
<i>G.clarum</i>	-	62,1	35,0	alta	29,3	15,4
<i>G.margarita</i>	-	81,0	45,6	alta	23,9	12,7
Tainung n°1						
Controle	197,4	-	-	-	94-119	47-62
<i>G.clarum</i>	-	68,3	34,6	alta	25,5	13,5
<i>G.margarita</i>	-	79,5	40,3	alta	25,3	13,5

<sup>(1)</sup> Primeiro e segundo valores correspondem ao P aplicado e disponível no controle (não inoculado), necessários para atingir a produção equivalente à colonização por *G. clarum* e *G. margarita*, respectivamente. (Modificado de Trindade et al., 2001a).



Estudos empregando compostos fenólicos, especialmente do grupo dos flavonóides, já demonstraram que há estímulo da micorrização da planta, acelerando e aumentando a colonização das raízes por FMAs, o que pode maximizar os benefícios da associação para as plantas (Siqueira et al., 1991). Martins et al. (2000a) observaram que adição de rutina a uma mistura de solo e areia (1:2, v/v) e inoculação de *G. clarum* e *G. macrocarpum* proporcionaram maior crescimento e conteúdo de P em plantas de mamão, mas apenas na menor concentração de P no solo ( $6 \text{ mg dm}^{-3}$  de P).

O mamoeiro é uma planta com elevada resposta à colonização micorrízica (Weber & Amorim, 1994). Entretanto, a grande maioria dos trabalhos é realizada em condição de solo/substrato desinfestado ou esterilizado, havendo necessidade de ser avaliada a eficiência do FMA selecionado na presença de FMAs nativos. Neste sentido, Trindade et al. (2000b), empregando solo desinfestado ou não por fumigação e fungos nativos e exóticos selecionados em solo fumigado, concluíram que todos os fungos inoculados apresentaram eficiência simbiótica para o mamoeiro em solo não fumigado, destacando-se os FMAs exóticos - *G. clarum* e *G. margarita* - e o nativo - isolado 29 (*Gigaspora* sp); os isolados nativos foram mais eficientes nas maiores concentrações de P no solo. Os fungos previamente selecionados em solo fumigado mostraram também eficiência simbiótica em solo não fumigado, ou seja, na presença de uma comunidade de fungos micorrízicos nativos. Resultado semelhante foi obtido por Minhoni e Auler (2003), que observaram que a fumigação do solo não interferiu no crescimento das plantas de mamão colonizadas por *G. macrocarpum*. Os maiores efeitos da micorrização ocorreram com adição de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de P ao solo e foram equivalentes à adição de  $240 \text{ mg kg}^{-1}$  de P ao solo para as mudas não micorrizadas.

#### 4. Associação Micorrízica em Maracujazeiro

Atualmente, o Brasil é o principal produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpus* Deg.). O crescente interesse no seu cultivo decorre principalmente do seu elevado potencial para a exportação de suco e pela conscientização da população quanto ao seu elevado teor nutritivo. Em face de essa perspectiva torna-se necessário a melhoria da qualidade e da produtividade de mudas selecionadas, com maior capacidade competitiva no mercado mundial. Devido ao sistema radicular do maracujazeiro apresentar poucos pelos absorventes e radículas, há necessidade da aplicação de elevadas doses de P na fase de produção de mudas e no plantio de pomares, apresentando, portanto, grande potencial para a associação com FMAs (Collozzi-Filho & Carvalho, 1993), o que pode reduzir a necessidade da aplicação de altas doses de P para a produção de mudas de boa qualidade (Soares, 1994).

Entre os vários fatores que podem interferir na simbiose micorrízica, o substrato é um dos mais importantes, principalmente no que diz respeito ao nível de P disponível, pois a infectividade e eficiência do FMA variam com o grau de fertilidade do substrato. Cavalcante et al. (2002), observaram que a desinfestação do solo (fumigação) e a adubação fosfatada, até  $30 \text{ mg dm}^{-3}$  de P, promoveram maior crescimento do maracujazeiro colonizado, principalmente, por *Gigaspora albida* ou por mistura de FMAs (inóculo misto), cujo efeito benéfico começou a ser evidenciado a partir de 50 dias da inoculação.

Em solo não desinfestado, o crescimento das plantas foi menor e não houve resposta à inoculação dos FMAs. Outro aspecto importante é a presença de matéria orgânica que melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo/substrato, elevando o pH e a disponibilidade de macro e micronutrientes (Freitas, 2001). Silveira et al. (2003) constataram que a obtenção de mudas de maracujazeiro amarelo colonizadas por um isolado de *Glomus* sp (IAC-28) empregando um substrato com 10% de matéria orgânica (esterco de curral) foi comparável às colonizadas por *Acaulospora* sp (IAC-44) e *Acaulospora morrowea*, mas em substrato com 25% de esterco. A adição de diferentes fontes e concentrações de matéria orgânica para adequação do substrato visando produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-amarelo mostrou que as plantas somente responderam à adição de composto de lixo urbano quando micorrizadas e que houve efeito da micorrização a partir da adição de 10% de esterco de curral, não se igualando, entretanto, ao emprego de 40% de matéria orgânica, que promoveu melhor crescimento e vigor das plantas (Bento, 1997). Isso evidencia o potencial de utilização desses fungos no manejo de produção de mudas, como agentes de redução e melhor aproveitamento de insumos.

Estudo com compostos fenólicos que podem estimular a micorrização em plantas, pelo estímulo na germinação de esporos, crescimento micelial e colonização radicular, foi realizado por Soares & Martins (2000), empregando uma mistura solo-areia (1:2, v/v) desinfestada por fumigação e com adição dos compostos, para produção de plântulas de maracujazeiro, que foi posteriormente transplantada para substrato não desinfestado. Concluíram que a micorrização, por *G. clarum*, *Glomus fasciculatum* e inóculo misto de FMAs nativos, aumentou o crescimento e teor de nutrientes nas plantas, desde o desenvolvimento inicial da muda até a fase posterior ao transplante para o solo não desinfestado. Os compostos fenólicos, principalmente quercetina e morina, somente tiveram efeito no substrato não desinfestado e com baixa concentração de P, estimulando a colonização radicular pela comunidade nativa de FMAs presentes no solo e o crescimento das mudas.

Tanto a colonização micorrízica quanto a composição de flavonóides nas raízes são alteradas pelo estado nutricional da planta. As raízes de maracujazeiro são capazes de sintetizar compostos fenólicos, possivelmente flavonóides, que variaram em função da colonização por diferentes espécies de FMAs, crescimento da planta e estresse nutricional (Soares et al., 2005).

Em geral, a micorrização aumenta o crescimento de plantas de maracujazeiro, mesmo sob estresse hídrico (Cavalcante et al., 2001). As plantas associadas aos FMAs e submetidas ao estresse apresentaram maiores valores de resistência difusiva e temperatura foliar e menores taxas de transpiração que as não estressadas e as não micorrizadas, principalmente quando colonizadas por *G. albida*.

Devido sua importância econômica, a maioria dos trabalhos emprega o maracujazeiro-amarelo. Entretanto, Silva et al. (2004) avaliaram o efeito da associação micorrízica na produção de muda do maracujazeiro - doce (*Passiflora alata* Curtis), que constitui, apesar do alto preço de mercado, cultura rentável e em plena expansão. Empregando solo desinfestado por fumigação e com uma concentração de P de 8 mg dm<sup>-3</sup>, verificaram que, entre os FMAs empregados, somente *G. albida* beneficiou

o crescimento da planta. Posteriormente, Anjos et al. (2005) observaram que o benefício da micorrização ocorreu a partir de 30 dias após a inoculação de *G. albida* e de inóculo com FMAs nativos, reduzindo o tempo necessário para a produção da muda, sendo que o efeito positivo no crescimento da planta ocorreu em solo desinfestado ou não, com adição de até  $16 \text{ mg dm}^{-3}$  de P.

Poucos experimentos são realizados em condições de campo para constatar se a eficiência da micorrização na fase de muda se mantém após transplantio para o campo. Collozi Filho & Carvalho (1993) relataram que as mudas de maracujeiro previamente micorrizadas, especialmente por *G. margarita*, produziram mais que as mudas não micorrizadas, no campo.

Outro aspecto ainda pouco estudado é o emprego conjunto de microrganismos benéficos, rizosféricos ou endofíticos, na produção de mudas de fruteiras. A interação de bactérias promotoras do crescimento de plantas, diazotróficas ou não, e FMAs pode resultar em aumentos significativos no crescimento da planta, melhora no vigor e sanidade, garantindo maior sobrevivência da muda no campo, após o transplantio. Graça et al. (1991) observaram que a inoculação conjunta de *Azospirillum brasilense* e *Glomus etunicatum* aumentou o crescimento das mudas de maracujazeiro-amarelo, produzidas em solo desinfestado.

## 5. Associação Micorrízica em Bananeira

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de banana, em fase de expansão da cultura, o que exige mudas de alta qualidade genética e fitossanitária. A bananeira é uma planta que responde à inoculação de FMAs (Declerck et al., 1994), principalmente ao *G. macrocarpum*, apresentando variação no grau de dependência micorrízica da variedade (Declerck et al., 1995). Além do efeito benéfico na promoção do crescimento, tem sido constatado maior tolerância da bananeira micorrizada a condições de estresse. Ruyikiri et al. (2000) concluíram que a inoculação de *G. intraradices* foi eficiente em diminuir os efeitos negativos da toxicidade de Al em plantas de banana, diminuindo o acúmulo de Al na parte aérea e raiz e aumentando de Ca, Mg e P, o que é de grande importância para uma planta de região tropical. Da mesma forma, a colonização de plântulas de bananeira por *G. etunicatum* e *G. clarum* aumentou sua tolerância ao estresse salino, o que pode beneficiar o cultivo desta planta na região semi-árida brasileira, onde a irrigação para produção de plantas frutíferas tem causado aumento na salinidade do solo (Yano-Melo et al., 2003).

As pesquisas têm se concentrado na micorrização de mudas micropropagadas de bananeira, que passam necessariamente por um período de aclimatização, com utilização de substrato desinfestado, o que permite a introdução de FMAs que atuam como bioreguladores do crescimento das plantas, biofertilizantes e biocontroladores de organismos patogênicos, como revisado por Lovato et al. (1996).

Inúmeros fatores concorrem para a otimização do efeito da micorrização na produção de mudas micropropagadas, como o melhor momento para a inoculação do FMA e o substrato a ser utilizado, já que este modula o estabelecimento e o desempenho da associação micorrízica. Jaizme-Vega et al. (1997) observaram que a inoculação de *Glomus mosseae* resultou em efeito no crescimento da planta já nos primeiros estádios de desenvolvimento pós-*vitro*, que se tornou mais evidente na fase de endurecimento. Lins et al. (2003) constataram que a introdução de *Gigaspora margarita* mostrou-se benéfica em qualquer dos estádios de crescimento de plântulas micropropagadas de bananeira (estádios de enraizamento), principalmente quando empregado o substrato turfa + vermiculita + 5% de esterco, o que favoreceu, inclusive, a antecipação do início da fase de aclimatização das plântulas. Este mesmo efeito da combinação FMA - substrato foi observado por Trindade et al. (2003), que ainda concluíram que o uso de vermicomposto é promissor para a produção de muda de bananeira e que o substrato Rendmax Citrus promoveu o melhor crescimento das plantas independentemente da micorrização. A adição de 10% esterco de curral também favoreceu o crescimento e absorção de P por plântulas de bananeira colonizadas por *G. clarum*, a partir de 65 dias de aclimatização (Matos et al., 2002). O emprego de uma mistura de materiais orgânicos (bagaço de cana e torta de filtro de usina açucareira) e vermiculita na forma de bloco prensado, ao invés de tubetes plásticos, incrementou o crescimento e absorção de nutrientes por mudas de bananeira colonizadas por *G. clarum* (Leal et al., 2005).

## 6. Associação Micorrízica em Outras Plantas Frutíferas Tropicais

O emprego de FMAs no sistema de produção possui grande potencial no estabelecimento de um cultivo racional e eficiente de mudas de boa qualidade de várias plantas frutíferas, que, na maioria, são dependentes da micorriza. Já se constatou que na ausência de colonização micorrízica, não houve resposta do abacateiro e da mangueira à adição de superfosfato, enquanto que o uso combinado do superfosfato simples (SS) e da inoculação de FMAs incrementou o crescimento inicial das mudas (Silva e Siqueira, 1991). Utilizando como substrato uma mistura de solo e vermiculita, constataram que o crescimento do abacateiro foi estimulado pelos fungos *Glomus clarum*, *Glomus intraradices*, *Scutellospora heterograma* e *Gigaspora margarita*, quando na presença de SS. As mudas de mangueira só responderam à inoculação com *Gigaspora margarita* e ao inóculo misto (mistura de fungos), mas também com a adição de SS. Plantas micorrizadas de mangueira superaram em crescimento as não micorrizadas em todas as doses de SS aplicadas ao substrato e foram mais eficientes em utilizar o P adicionado, necessitando apenas de 25% da quantidade de SS usada pela planta não micorrizada para produzir a mesma quantidade de biomassa (Azevedo et al., 1995).

O efeito da desinfestação do substrato para obtenção de mudas micorrizadas de mangueira foi avaliado por Silva et al. (1994). Em substrato desinfestado por fumigação, a maioria dos FMAs inoculados promoveu maior crescimento e precocidade das mudas, destacando-se *Scutellospora heterogama*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp. Já em substrato não desinfestado, os

FMA's mais eficientes foram *G. clarum* e *Entrophospora colombiana*. Utilizando um inóculo misto, composto por estas espécies fúngicas mais eficientes, Silveira et al. (1995) constataram que o maior crescimento das plantas de mangueira foi obtido com a adição de 10% de esterco de curral ao substrato, enquanto que para as plantas não micorrizadas, a resposta às doses aplicadas foi linear. A partir do terceiro mês após a repicagem das plântulas, as plantas micorrizadas já se destacavam.

A goiabeira também responde à inoculação de FMA's, como constatado por Kumaran e Azizah (1995), principalmente quando colonizadas por *G. clarum* e *Scutellospora calospora* que promoveram incremento na produção de biomassa e absorção de nutrientes. Samarão e Martins (1999) também observaram resposta da goiabeira à micorrização, mesmo na dose mais alta de P aplicada ao substrato (50 mg dm<sup>-3</sup>). Utilizando como substrato resíduos da indústria açucareira (bagaço e torta de filtro), Schiavo e Martins (2002) concluíram que a inoculação de *G. clarum* promoveu o crescimento das mudas, mas apenas no sistema de blocos prensados.

Apesar da produção comercial da gravioleira (*Annona muricata* L) ainda ser pouco expressiva, existe um grande potencial dessa cultura em relação à exportação de sucos e derivados (Pinto & Silva, 1995). O efeito da inoculação de FMA's no desenvolvimento de mudas de gravioleira foi avaliado por Chu et al. (2001). Concluíram que a gravioleira responde muito bem à inoculação de FMA's, especialmente *Gigaspora margarita*. Em solo fumigado, houve aumento no crescimento e absorção de nutrientes, principalmente quando se utilizou *Scutellospora heterogama* e *Gigaspora margarita*, sendo que a eficiência micorrízica variou de 594% a 1.348%. Embora o efeito da inoculação tenha sido reduzido em solo não fumigado, ainda houve um incremento no crescimento das plantas colonizadas por *G. margarita*, *Gigaspora* sp. e *E. colombiana*.

Dentre as fruteiras de importância comercial no Nordeste, o cajueiro, (*Anacardium occidentale* L.) assume grande importância econômica e social. Cardoso (1994) verificou que a inoculação de *Glomus macrocarpum* e a adubação fosfatada não proporcionaram efeitos benéficos ao desenvolvimento das mudas do cajueiro-anão-precoce e nem na antecipação do tempo de enxertia. Da mesma forma, Baker (1994) avaliou os efeitos de húmus de minhoca e da inoculação de FMA's no desenvolvimento de mudas de cajueiro-anão-precoce, aos 60 dias após a inoculação, e observaram que a inoculação também não proporcionou benefício no crescimento das plantas, mas que o húmus de minhoca revelou-se uma alternativa promissora. Entretanto, Weber et al. (2004) constataram que a micorrização do cajueiro por FMA's nativos (mistura de *G. etunicatum*, *G. glomerulatum*, *Scutellospora* sp. e *Acaulospora foveata*) e exóticos (mistura comercial "Mycogold") proporcionou melhor desenvolvimento das plantas, mas após 4 meses da inoculação.

A mangabeira, (*Hancornia speciosa* Gomes), é uma fruteira tropical que vem sendo explorada apenas na forma extrativista, mas que apresenta um elevado potencial para o mercado consumidor brasileiro. A colonização tanto por *Gigaspora margarita* quanto *Glomus etunicatum* contribuiu para o desenvolvimento da planta (Costa et al., 2000). A mangabeira mostrou-se dependente da micorrização somente em níveis baixos de P no solo desinfestado e, principalmente, quando colonizada por *G. albida* (Costa et al., 2005).

O açai (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Região Amazônica, cujo fruto é bastante apreciado, e com importante perspectiva para o comércio interno e externo, no que se refere à indústria do palmito. Não obstante sua capacidade adaptativa relativamente elevada, essa planta apresenta crescimento lento e uma elevada taxa de morte de plântulas em sementeira, fato que limita a expansão da cultura (Bovi et al, 1987). Nesse aspecto, o estabelecimento da associação micorrízica pode ser importante, como constatado por Chu (1999), que observou alta dependência da planta à micorrização e reposta à inoculação principalmente de *Scutellospora gilmorei* e *Acaulospora* sp, que promoveram aumento significativo no crescimento e na absorção de nutrientes pelo açazeiro.

Praticamente todas as regiões brasileiras estão produzindo acerola (*Malpighia glabra* L), principalmente no Nordeste brasileiro, onde está se tornando uma das atividades mais rentáveis, pela demanda de polpas e sucos no mercado. Um dos maiores problemas em relação ao cultivo da acerola, refere-se à propagação, com baixo percentual de germinação das sementes e pegamento das estacas, além do crescimento bastante lento. A inoculação de FMAs e adubação fosfatada pode favorecer a obtenção de mudas da aceroleira, como observado por Lima & Freire (2001). Esses autores mostraram que adição de 500 mg dm<sup>3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, conjuntamente com adubação de NK, associada à inoculação de *Glomus clarum* promoveu maior crescimento das plantas e aumento na absorção de nutrientes. Costa et al. (2001) também observaram que a micorrização pode reduzir pela metade o tempo de produção de mudas de aceroleira, após o enraizamento das estacas, e que a inoculação de *G. margarita* e *G. etunicatum* promoveu o crescimento das plantas do genótipo Miro, enquanto as plantas do genótipo Barbados foram mais beneficiadas por *G. margarita*, mostrando que a eficiência da associação entre FMA e aceroleiras é regulada pela combinação genótipo - fungo.

A cultura do abacaxi pouco responde à adubação fosfatada e sintomas de deficiências podem surgir principalmente em condições de estresse, como a baixa umidade do solo ou a qualquer comprometimento do sistema radicular da planta. Mourichon (1981) atribuiu a adaptação do abacaxizeiro, em solos deficientes em P, ao benefício proveniente da associação com FMAs. Siqueira et al. (1996) não observaram grande dependência da planta à micorriza, mas houve incremento no crescimento em resposta à inoculação de *G. etunicatum* nos níveis mais altos de P no solo.

## Referências

- AGNANI, D.R.G.; CUNHA, M.I.B.; MARCONATO, M.S.M.; AGUILLAR-VILDOSO, I.C.; SILVEIRA, A.P.D. Interação porta-enxertos de citros X fungos micorrízicos arbusculares em substrato esterilizado e não esterilizado. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7, Caxambu, 1998. Resumos. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1998. p.447.
- AMIJEE, F.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P B. The development of endomycorrhizal root systems: effects of soil phosphorus and fungal colonization on the concentration of soluble carbohydrates in roots. **The New Phytologist**, v. 123, n.2, p.297-306, 1993.

ANJOS, E.C.T.; CAVALCANTE, U.M.T.; SANTOS, V.F.; MAIA, L.C. Produção de mudas de maracujazeiro-doce micorrizadas em solo desinfestado e adubado com fósforo. **Pesq. agropec. bras.**, v.40, n.4, p.345-351, 2005.

ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. O Fósforo e a micorriza vesículoarbuscular no crescimento de porta-enxertos de citros cultivados em solo natural. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.14, p. 277-282, 1990.

ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant Soil**, v.131, p.11-19, 1991.

AZEVEDO, I.C.; SILVEIRA, A.P.D.; OLIVEIRA, E. Efeito da adubação fosfática e de fungos micorrízicos arbusculares (MA) na produção de muda de mangueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, 1995, Lavras. *Resumos*. Lavras: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1995. p.255.

BAKER, A.P. Efeito do húmus de minhoca e da inoculação do fungo micorrízico arbuscular *Glomus macrocarpum* Tul. & Tul. sobre o desenvolvimento de mudas porta-enxertos de cajueiro-anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.). Fortaleza, 1994. 61p. Universidade Federal do Ceará. (Dissertação de Mestrado).

BENTO, M.M. Fontes de matéria orgânica na composição do substrato para produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro. Piracicaba, 1997. 59p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. (Dissertação de Mestrado).

BOVI, M.L.A.; GODOY JUNIOR, G.; SÁES, L.A. Pesquisas com os gêneros *Eutерpe* e *Bactris* no Instituto Agrônomo de Campinas. **O Agrônomo**, v.39, n.2, p.129-172, 1987.

CALDEIRA, S.F.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L. Associação de micorriza vesicular-arbuscular com café, limão rosa e capim-gordura. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.18, n.3, p.223-228, 1983.

CAMARGO, I.P.; SOUZA, M.; CARVALHO, J.G.; OLIVEIRA, E. Doses e fontes de fósforo e de fungos micorrízicos sobre a nutrição mineral do limoeiro 'Cravo' até a repicagem. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.25, n.10, p.1465-1470, 1990.

CARDOSO, B.B. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da adubação mineral fosfatada sobre o crescimento de porta-enxerto de cajueiro Anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.) Fortaleza, 1994. 46p. Universidade Federal do Ceará. (Dissertação de Mestrado).

CARDOSO, E.J.B.N.; LAMBAIS, M.R. Aplicações práticas de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) In: CARDOSO, E.J.B. C. ; TSAI, S. M. & NEVES, M.C.P. (Coord.) **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 283 - 296.

CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D.; OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo - arbusculares em porta - enxertos de citros. **Rev. Bra. Ci. Solo**, v.10, p.25-30, 1986.

CASAGRANDE R.; MACHADO, J.O.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, D. Eficiência de inóculos de fungos endomicorrízicos sobre o desenvolvimento inicial do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv Sunrise Solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1986, Brasília. *Resumos*. Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1986. p. 365-370.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, V.F. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*passiflora edulis* sims. f. *flavicarpa* deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. **Acta Bot. Bras.**, v.15, n.3, p. 379-390, 2001.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; CAVALCANTE, A.T.; SANTOS, V.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **R. bras. Ci. Solo**, v.26, p.1099-1106, 2002.

CHU, E. Y. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seedlings. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.34, n.6, p.1019-1024, 1999.

CHU, E.Y.; MÖLLER, M.R.F.; CARVALHO, J.G. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de gravioleira em solo fumigado e não fumigado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, n.4, p.671-680, 2001.

CLEMENT, C.R.; HABTE, M. Genotypic variation in vesicular-arbuscular mycorrhizal dependence of the peijibaye palm. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.9, p.1907-1916, 1995.

COLOZZI-FILHO, A.; CARVALHO, S.L.C. Efeitos de micorrizas arbusculares na produção do maracujazeiro a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24, Goiânia, 1993. Programas e resumos. Goiânia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993. p. 287-288.

COSTA, C. M. C.; MAIA, C. L.; CAVALCANTE, U. M. T.; LIMA JÚNIOR, M. R. de; OLIVEIRA, F.N. Influência de fungos micorrízicos arbusculares e da adubação com fósforo no crescimento de mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 25, Santa Maria, 2000. *Anais*. Santa Maria: UFSM/SBCS, 2000. (CD-ROM).

COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; MANSUR, R.J.; NOGUEIRA, C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 36, n.6, p.893-901, 2001.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B.T.; SANTOS, V.F.; MAIA, C. L. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.40, n.3, p.225-232, 2005.

CUNHA, M.I.B. Parasitismo de fungos micorrízicos arbusculares e cinética de absorção de fósforo em plantas cítricas. Piracicaba, 1999. 106p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. (Dissertação de Mestrado).

DECLERCK, S.; DEVOS, B.; DELVAUX, B.; PLENCHETTE, C. Growth response of micropropagated banana plants to VAM inoculation. **Fruits**, v.49, n.2, p.103-109, 1994.

DECLERCK, S.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. **Plant and Soil**, v.176, p.183-187, 1995.

FERNANDES, D. M.; CORRÊA, L. de; S.; FERNANDES, F. M. Efeito da adubação nitrogenada e fosfatada em mamoeiro (*Carica papaya* L.) "Solo" cultivado com irrigação. **Científica**, v.18, n.1, p.1-8, 1990.

FRANÇA, S.C. Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares nos manejos convencional e orgânico de citros e suas interações com *Phytophthora parasítica*. Piracicaba, 2004. 107p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. (Tese de Doutorado).



FREITAS, G.B. Clima e Solo. In: BRUCKNER, C.H.; PICANCO, M.C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 69-83.

GRAÇA, JERÔNIMO; MACHADO, J. O.; RUGGIERO, C. & ANDRIOLI, J. L. Eficiência de fungos endomicorrízicos e da bactéria *Azospirillum brasilense*, sobre o desenvolvimento de mudas do maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 13, n. 4. p.125-130, 1991.

GOMES, V.F.F. Níveis de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de porta-enxertos cítricos. Piracicaba, 1997. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. (Tese de Doutorado).

GRAHAM, J.H.; DUNCAN, L.W. & EISSENSTAT, D.M. Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. **New Phytol.**, v.135, p.335-343, 1997.

JAIZME-VEGA, M. C. et al. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. **Plant and Soil**, v.196, p.27-35, 1997.

KLEINSCHMIDT, G.D.; GERDEMANN, J.W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizal fungi. **Phytopathol.**, v.62, p.1447-1453, 1972.

KOIDE, J.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **The New Phytologist**, v. 117, n.3, p.365-386, 1991.

KUMARAN, S.; AZIZAH, H.C. Influence of biological soil conditioner on mycorrhizal versus non-mycorrhizal guava seedlings. **Tropical Agric.**, v.72, n.1, p.39-43, 1995.

LACKIE, S.M.; BOWLEY, S.R.; PETERSON, R.L. Comparison of colonization among half-sub families of *Medicago sativa* L. by *Glomus versiforme* (Daniels and Trappe) Berch. **The New Phytologist**, v. 108, n. 4, p.477-482, 1988.

LEAL, P.L.; MARTINS, M.A.; RODRIGUES, L.A.; SCHIAVO, J.A. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira micorrizadas em diferentes recipientes. **Rev. Bras. Frutic.**, v.27, p.84-87, 2005.

LIMA, J. T.; FREIRE, V. F. Efeito da inoculação com fungos MVA e da adubação fosfatada no desenvolvimento de mudas de acerola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28, Londrina, 2001. Programas e resumos. Londrina, 2001. p.97.

LINS, G.M.L.; TRINDADE, A.V.; ROCHA, H.S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 1, p. 143-147, 2003.

LOVATO, P.E.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Micorrização de plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**, Lavras, 1996. p.175-202.

MAIORANO, J.A. Utilização de substratos orgânicos comerciais na obtenção de mudas micorrizadas de limoeiro 'Cravo' em ambiente protegido. Campinas, 2003. 63p. Instituto Agrônomico. (Dissertação de Mestrado)

MARONECK, D.M.; HENDRIX, J.W.; KIERNAN, J. Mycorrhizal fungi and their importance in horticultural crop production. In: MENDER, W.J.; MARDUSKY, F.J.; PIERCE, L.C. (Eds.) **Horticultural Reviews**. Connecticut, AVI Publ., 1981. p.172-213.

MARTINS, M.A.; GONÇALVES, G.F.; SOARES, A.C.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.35, n.7, p. 1465-1471, 2000.

MARX, D.H.; BRYAN, W.C.; CAMPBELL, W.A. Effect of endomycorrhizae formed by *Endogone mosseae* on growth of citrus. **Mycologia**, v.63, p. 1222-1226, 1971.

MATOS, R.M.B.; SILVA, E.M.R.; BRASIL, F.C. Micorriza arbuscular e matéria orgânica na aclimatização de mudas de bananeira, cultivar Nanicão. **Bragantia**, v.61, n.3, p.277-283, 2002.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Boletim Técnico 200, IAC, 2005.

McGRAW, A.C.; SCHENCK, N.C. Growth stimulation of citrus, ornamental, and vegetable crops by select mycorrhizal fungi. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v.93, p.201-205, 1980.

MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. .Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v. 23, n. 1, p. 53-58, 1999b.

MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.23, p.59-67, 1999.

MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro Cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck]. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.24, p.767-775, 2000.

MENGE, J.A.; LABANAUSKAS, C.K.; JOHNSON, E.L.V.; PLATT, R.G. Partial substitution of mycorrhizal fungi for phosphorus fertilization in the greenhouse culture of citrus. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.42, n.6, p.926-930, 1978.

MINHONI, M.T.A; AULER, P.A.M. Efeito do fósforo, fumigação do substrato e fungo micorrízico arbuscular sobre o crescimento de plantas de mamoeiro. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.27, p.841-847, 2003.

MOURICHON, X. Mise en évidence d'une association endomycorrhizine chez l'ananas en Côte d'Ivoire. **Fruits**, 36:745-749, 1981.

NEMEC, S. Responses of six citrus rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. **Proc. State Hort.Soc.**, v.91, p.10-14, 1978.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth and phosphorus uptake in mycorrhizal rangpur lime seedlings under different levels of phosphorus. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.41, n.1, p.93-99, 2006.

OLIVEIRA, A.A.R.; COELHO, Y.S. Infecção micorrízica em pomares de citros no Estado de Sergipe. **Rev. Bras. Frutic.**, v.17, n.3, p.77-84, 1995.

OLIVEIRA, A.A.R.; COELHO, Y.S. & MATTOS, C.R.R. Infecção micorrízica em pomares de citros no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, Brasília, 1986, v.1, Anais. p.195-198.

- OLIVEIRA, A.A.R.; WEBER, O.B.; SILVA, A.C.G.M. Micorrização e crescimento de porta-enxertos de citros em função de inóculos micorrízicos vesículo-arbusculares. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.27, n.7, p.1049-1056, 1992.
- PANZANI, C.R.; PRATES, H.S.; GREVE, A. Sistema de produção de muda certificada de citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.15, n.1, p. 175-199, 1994.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K.; HODGE, N.C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply: analysis of carbon costs. **Plant Physiol.**, v.101, p.1063-1071, 1993.
- PINTO, A.C.Q.; SILVA, E.M. A cultura da graviola. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 105p. (Coleção Plantar, 31).
- RAMIREZ, B.N.; MITCHELL, D.J.; SCHENCK, N.C. Establishment and growth effects of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in papaya. **Mycologia**, v.67, p. 1039-1041, 1975.
- REGO, I.A.C. Efeito de diferentes práticas culturais adotadas em pomar de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre a eficiência de fungos micorrízicos arbusculares nativos e ocorrência de espécies. Cruz das Almas, 2000. 54p. Universidade Federal da Bahia. (Dissertação de Mestrado).
- ROCHA, M.R.; OLIVEIRA, E.; CORRÊA, G.M.C. Efeitos de doses de fósforo e fungos MVA no crescimento e nutrição mineral da tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort ex Tan) em sementeira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.29, n.5, p. 725-731, 1994.
- ROCHA, M.R.; CORRÊA, G.M.C.; OLIVEIRA, E. Efeito de fungos MVA e doses de fósforo nos teores de nutrientes em tangerina 'Cleópatra'. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.30, n.10, p. 1253-1258, 1995.
- RUFYIKIRI, G.; DECLERCK, S.; DUFEY, J.E.; DELVAUX, B. Arbuscular mycorrhizal fungi might alleviate aluminium toxicity in banana plants. **New Phytol.**, v.148, p.343-352, 2000.
- SAMARÃO, S.S.; MARTINS, M.A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares, associada à aplicação de rutina, no crescimento de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, v.21, n.2, p.196-199, 1999.
- SCHIAVO, J.A.; MARTINS, M.A. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*, em substrato agro-industrial. **Rev. Bras. Frutic.**, v.24, n.2, p.519-523, 2002.
- SCHENCK, N.C.; TUCKER, D.P.H. Endomycorrhizal fungi and the development of citrus seedlings in Florida fumigated soils. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.99, n.3, p.284-287, 1974.
- SENA, J.O.A.; LABATE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Caracterização fisiológica da redução de crescimento de mudas de citros micorrizadas em altas doses de fósforo. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.28, p.827-832, 2004.
- SILVA, L.F.C.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teores de nutrientes de mudas de abacateiro, mangueira e mamoeiro sob influência de diferentes espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.15, n. 3, p.283-288, 1991.
- SILVA, L.R.C.; SILVEIRA, A.P.D.; AZEVEDO, I.C. Seleção de fungos micorrízicos VA para produção de muda de mangueira, em substrato esterilizado e não esterilizado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, Londrina, 1994. Resumos. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1994. p.97.

SILVA, M.A.; CAVALCANTE, U.M.T.; SILVA, F.S.B.; SOARES, S.A.G.; LEONOR COSTA MAIA, L.C. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota)1. **Acta bot. bras.**, v.18, n.4, p. 981-985, 2004.

SILVEIRA, A.P.D.; AZEVEDO, I.C.; OLIVEIRA, E. Obtenção de muda de mangueira influenciada pela adição de fungos micorrízicos arbusculares e de matéria orgânica ao substrato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995. *Resumos*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. p.433-434.

SILVEIRA, A.P.D.; SILVA, L.R.; AZEVEDO, I.C.; OLIVEIRA, E.; MELETTI, L.M.M. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo, em diferentes substratos. **Bragantia**, v.62, n.1, p.89-99, 2003.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbuscular em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J. O; NAIR, M. G.; HAMMERSCHIMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p.63-121, 1991.

SIQUEIRA, D.L.; ZAMBOLIM, L.; CARDOSO, A.A. Crescimento vegetativo do Abacaxizeiro associado a fungos micorrízicos, com diferentes doses de fósforo. **Rev. Ceres**, v.43, p. 409-425, 1996.

SOARES, I. Associação micorrízica na cultura do maracujá. In: SÃO JOSÉ, A R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória: Universidade Estadual Sudoeste da Bahia, 1994. p. 91-98.

SOARES, A.C.F.; MARTINS, M.A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares, associada à adição de compostos fenólicos, no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpus*). **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.24, p.731-740, 2000.

SOARES, A.C.F.; MARTINS, M.A.; MATHIAS, L.; FREITAS, M.S.M. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. **Sci. Agric.**, v.62, n.4, p.331-336, 2005.

SOUZA, P.V.D.; FONFRIA, M.A.; BERJON, M.A.; ORENGA, V.A. Interação entre auxinas de síntese e fungos micorrízicos arbusculares: influência sobre o desenvolvimento vegetativo de plântulas de laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.). **Pesq. Agrop. Gaúcha**, v.2, n.2, p.167-172, 1996.

SOUZA, P.V.D.; BERJON, M.A.; ORENGA, V.A.; FONFRIA, M.A. Desenvolvimento do citrange 'Troyer' infectado com fungo micorrízico, em dois substratos de cultivo. **Pesq. Agrop Bras.**, v.32, n 10, p. 1039-1045, 1997.

SOUZA, P.V.D.; ABAD, M.; ALMELA, V.; AGUSTI, M. Efecto de substratos de cultivo y hongos micorrízicos arbusculares sobre el desarrollo vegetativo y el contenido em carbohidratos em plantas de Citrange Troyer injetadas de Mandarina Marisol. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 20, n. 2, p. 235-245, 1998.

SOUZA, P.V.D.; FONFRIA, M.A.; BERJON, M.A.; ORENGA, V.A. Desenvolvimento vegetativo e morfologia radicular de Citrange Carrizo por ácido indolbutírico e micorrizas arbusculares. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.249-255, 2000.

- SOUZA, P.V.D.; CARNIEL, E.; SCHMITZ, J.A.K.; SILVEIRA, S.V. Substratos e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento vegetativo de Citrange Troyer. **Agropec. Catarin.**, v.16, n.3, p.84-88, 2003.
- TRINDADE, A.V.; FARIA, N.G.; ALMEIDA, F.P. Uso de esterco no desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizadas com fungos micorrízicos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.35, n.7, p. 1389-1394, 2000a.
- TRINDADE, A.V.; SIQUEIRA, J.O.; ALMEIDA, F.P. Eficiência simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares em solo não fumigado, para mamoeiro. **Rev. bras. Ci. Solo**, v. 24, p.505-513, 2000b.
- TRINDADE, A.V.; SIQUEIRA, J.O.; ALMEIDA, F.P. Dependência micorrízica de variedades comerciais de mamoeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 36, n.12, p. 1485-1494, 2001a.
- TRINDADE, A.V.; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, F.P.; MAIA, I.C.S. Estimativa do coeficiente de determinação genotípica em mamoeiros (*Carica papaya* L.) inoculados com fungo micorrízico arbuscular. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 23, n. 3, p. 607-612, 2001b.
- TRINDADE, A.V.; LINS, G.M.L.; MAIA, I.C.S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 1, p. 137-142, 2003.
- WEBER, O.B.; LUZ, A.D. Adubação orgânica e inoculação com fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 12, n. 3, p. 7-16, 1990.
- WEBER, O.B. & AMORIM, S.M.C. Adubação fosfática e inoculação de fungos micorrízicos vesículos arbusculares em mameiro "Solo". **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.18, p. 187-191, 1994.
- WEBER, O.B., OLIVEIRA, E. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em citros nos Estados da Bahia e Sergipe. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.29, n.12, p.1905-1914, 1994.
- WEBER, O.B., OLIVEIRA, A.A.R.; MAGALHÃES, A.F.J. Adubação orgânica e inoculação com *Glomus etunicatum* em porta-enxertos de citros. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v. 14, p.321-326, 1990.
- WEBER, O.B.; SOUZA, C.C.M.; GONDIN, D.M.F.; OLIVEIRA, F.N.S.; CRISÓSTOMO, L.A.; CAPRONI, A.L.; SAGGIN JÚNIOR, O. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.39, n.5, p.477-483, 2004.
- YANO-MELO, A.M.; SAGGIN Jr., O.J.; MAIA, L.C. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. **Agric. Ecosys. Environ.**, v.95, p.343-348, 2003.

# Capítulo 5

## A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas

Elke Jurandy Bran Nogueira **CARDOSO** <sup>(1)</sup> e Marco Antonio **NOGUEIRA** <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

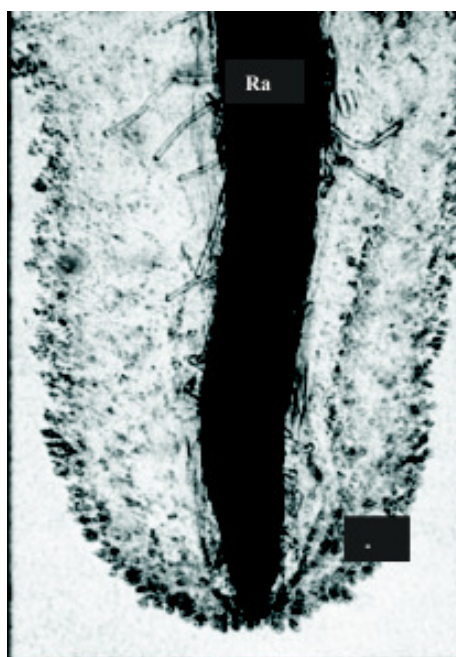
A rizosfera foi definida por Hiltner (1904) como a região ao redor das raízes, geralmente com 1 a 3 mm, onde há crescimento bacteriano, podendo variar de acordo com fatores relacionados ao solo, idade e espécie vegetal, dentre outros (Campbell & Greaves, 1990). Atualmente, a rizosfera é definida como “a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando proliferação microbiana” (Figura 1). Nela, os microrganismos desempenham importante papel nos sistemas naturais e agrícolas, já que participam das transformações da matéria orgânica e dos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes (Andrade, 1999). Mais especificamente, é ainda dividida em ectorrizosfera e endorrizosfera, compreendendo a parte externa e os tecidos corticais respectivamente. Já a superfície entre a raiz e o solo é denominada rizoplane. Nessas regiões, os mais variados grupos microbianos podem interagir (Figura 2).

Os exsudatos radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato. Por sua vez, os microrganismos influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudatos radiculares, por meio de seus efeitos no metabolismo das células da raiz, bem como no estado nutricional das plantas.

---

<sup>(1)</sup> Professora titular, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Solos e Nutrição de Plantas. CP 09, CEP-13418-900, Piracicaba, SP

<sup>(2)</sup> Professor, Universidade Estadual de Londrina, CCB/Departamento de Microbiologia. CP 6001, CEP- 86051-990, Londrina, PR

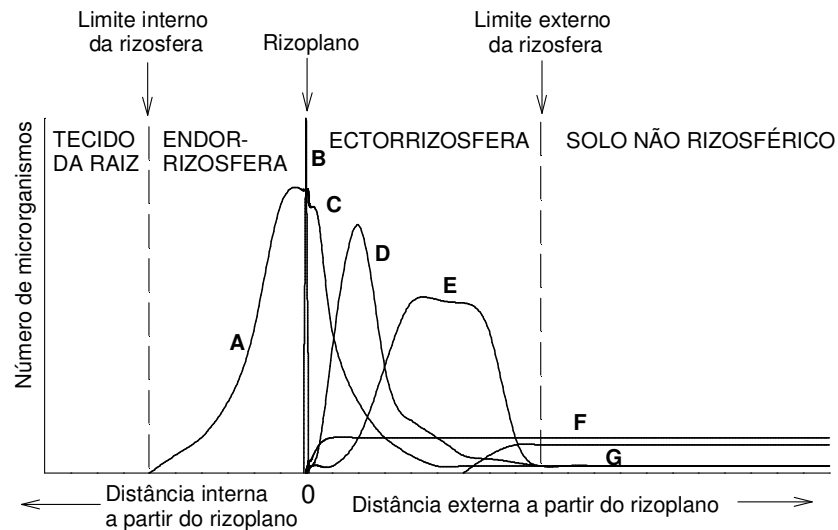


**Figura 1.** Rizosfera. Proliferação intensa de microrganismos ao redor da raiz (Ra) formando a rizosfera (Ri) (Andrade & Nogueira, 2005).

Assim, a comunidade microbiana da rizosfera pode variar em estrutura e composição de espécies em função do tipo de solo, espécie de plantas, estado nutricional, idade, estresse, doenças, dentre outros fatores ambientais (Mahafee & Kloepper, 1997; Griffiths et al., 1999). As interações raiz-microrganismos podem ocorrer em níveis que variam desde associações puramente comensais, passando pelas associações protooperativas e amensais, até as simbioses, que podem ser mutualísticas ou parasíticas. Dessa forma, várias interações ecofisiológicas ocorrem no ambiente rizosférico, e o que se observa como crescimento e produção vegetal é resultado dessas interações, favorecendo ou prejudicando a plena expressão do potencial genético da planta (Cardoso & Freitas, 1992). O reconhecimento dessas interações e o entendimento sobre como influenciam o desenvolvimento das plantas poderá permitir sua aplicação como uma ferramenta a mais a ser utilizada na sustentabilidade dos agroecossistemas, por meio do manejo do ambiente radicular.

## 2. Alterações Causadas pelas Raízes na Rizosfera

As raízes das plantas absorvem íons da solução do solo de forma diferenciada, o que pode levar à depleção ou ao acúmulo de determinados íons na rizosfera. Além disso, também liberam  $H^+$ ,  $HCO_3^-$  e  $CO_2$ , o que causa mudanças no pH. O consumo ou liberação de  $O_2$  também levam a alterações no potencial redox (Marschner, 1995). Como consequência, ocorrem alterações na disponibilidade de nutrientes e na atividade microbiana.



**Figura 2.** Distribuição de grupos microbianos ao redor das raízes que podem ser divididos em: Internos à raiz: A = desenvolvem-se nos espaços intercelulares dentro da raiz; B = desenvolvem-se no rizoplano e seu número cai drasticamente à medida que se distancia desse local. Externos à raiz: C = São excluídos fisicamente do rizoplano pelos microrganismos B, mas utilizam material orgânico proveniente das raízes ou produtos dos organismos B ou ambos; D = São excluídos física ou bioquimicamente pelos microrganismos B e C, mas utilizam produtos dos organismos C, ou ainda materiais complexos provenientes das raízes e não utilizados pelos microrganismos B e C. E = Utilizam produtos secundários provenientes dos microrganismos rizosféricos mas estão em desvantagem competitiva em relação aos microrganismos B, C e D, sendo incapazes de competir por moléculas diretamente provenientes da raiz. F = Microrganismos comuns do solo não rizosférico, mas fisicamente excluídos dos nichos sobre ou próximo ao rizoplano, mas não são inibidos pelos demais microrganismos. G = Microrganismos comuns do solo não rizosférico, mas excluído da rizosfera pela atividade e produtos inibitórios dos demais (Ex.: sensibilidade a antibióticos e pouco hábeis em competir por fontes de C e elementos essenciais, como o Fe). Adaptado de Bazin et al. (1990).

Além das influências químicas que recebe, a rizosfera é rica em exsudatos, secreções, mucilagens, mucigel e lisados celulares. Os exsudatos são diferenciados das secreções, pois não envolvem gasto energético quando liberados pela raiz. Já as secreções atravessam membranas celulares por meio de transporte ativo, com gasto de energia metabólica. As mucilagens podem ser excretadas por células da coifa das raízes, por células externas da epiderme e pêlos radiculares ou ainda ter origem microbiana. O mucigel é composto de material gelatinoso de origem vegetal e microbiana, em interação com colóides minerais e orgânicos. Sua composição química é complexa devido às suas mais diversas origens, mas é um polissacarídeo composto principalmente de hexoses, pentoses e ácido urônico (Campbell & Greaves, 1990). Finalmente, os lisados são originários do rompimento de células corticais, provenientes da descamação das células decorrentes do atrito com o solo à medida que crescem longitudinalmente. Células epidérmicas também são desprendidas à medida que a raiz cresce em diâmetro e estas entram em senescência (Bolton et al., 1992). Diferentes espécies de plantas, bem como genótipos dentro da mesma espécie, influenciam qualitativa e quantitativamente a comunidade microbiana da rizosfera por diferenças quantitativas e qualitativas de seus exsudatos radiculares (Rengel, 1997; 2002a).



**Tabela 1.** Compostos orgânicos, inorgânicos e enzimas de origem vegetal encontrados na rizosfera de várias espécies de plantas (Compilado por Dakora & Phillips, 2002).

Ácidos orgânicos	Açúcares	Vitaminas	Purinas, nucleosídeos	Enzimas	Aminoácidos	Íons inorgânicos e gases
cítrico	glicose	biotina	adenina	fosfatases	todos os 20	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
oxálico	frutose	tiamina	guanina	ácidas e	aminoácidos	OH <sup>-</sup>
málico	galactose	niacina	citidina	alcalinas		H <sup>+</sup>
fumárico	maltose	pantotenato	uridina	invertase		CO <sub>2</sub>
succínico	ribose	riboflavina	-	amilase		H <sub>2</sub>
acético	xilose	-		protease		
butírico	ramnose	-	-	-	-	-
valérico	arabinose	-	-	-	-	-
glicólico	rafinose	-	-	-	-	-
piscídico	desoxir-ribose	-	-	-	-	-
fórmico	oligos-sacarídeos	-	-	-	-	-
aconítico	-	-	-	-	-	-
lático	-	-	-	-	-	-
pirúvico	-	-	-	-	-	-
glutárico	-	-	-	-	-	-
malônico	-	-	-	-	-	-
aldônico	-	-	-	-	-	-
eritrônico	-	-	-	-	-	-
tetrônico	-	-	-	-	-	-

A quantidade de carbono liberada pela planta para a rizosfera é equivalente ou maior que a quantidade de C gasta na respiração radicular, sendo que pode representar um consumo energético maior que o necessário para a absorção iônica, a qual representa até 20% da respiração de manutenção (Clarkson, 1985). A imensa variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes na rizosfera está relacionada na Tabela 1.

Frente a esse ambiente diferenciado, alterado quimicamente e rico em deposições de origem vegetal, não é difícil concluir que na rizosfera a atividade microbiana é diferente daquela que ocorre no solo não rizosférico. Cheng et al. (1993) quantificaram a emissão de CO<sub>2</sub> na rizosfera de plântulas de trigo e encontraram que 41% era proveniente da respiração radicular, enquanto que 59% era proveniente da atividade microbiana, às custas de energia fornecida pela rizodeposição. Dessa forma, a quantidade de microrganismos na rizosfera pode ser mais de mil vezes maior que no solo não rizosférico. A relação R/S expressa a relação existente entre o número de microrganismos no solo rizosférico (R) e no solo não rizosférico (S). Essa relação caracteriza a maior atividade microbiana na rizosfera, uma vez que geralmente é maior que 1 (Tabela 2), mas varia em função do grupo microbiano, espécie vegetal, dentre outros.

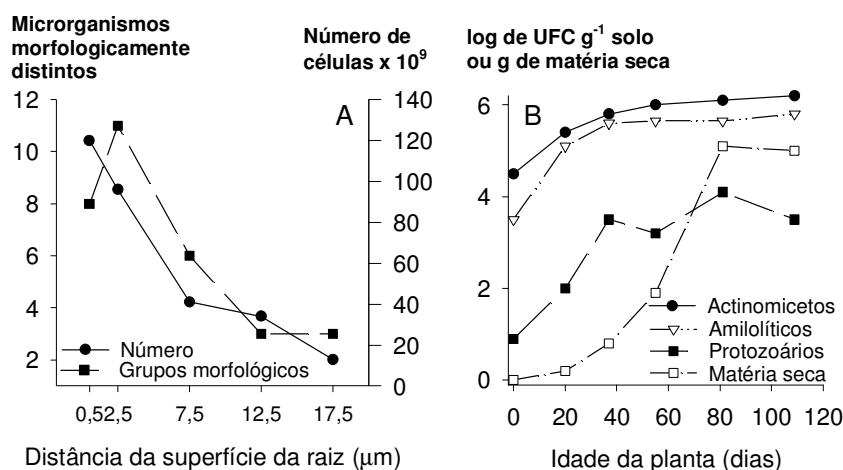
**Tabela 2.** Comunidade de grupos taxonômicos e funcionais na rizosfera de trigo e em solo não rizosférico, determinados pela contagem em placas (Adaptado de Bolton et al., 1992).

Comunidade	Rizosfera log UFC/g	Solo não rizosférico log UFC/g	Relação R/S
<b>Grupo taxonômico</b>			
Bactérias	9,08	7,7	24
Actinomicetos	7,66	6,85	6,6
Fungos	6,08	5	12
Protozoários	3,38	3	2,4
Microalgas	3,7	4,43	0,2
<b>Grupo funcional</b>			
Amonificantes	8,7	6,6	125
Anaeróbios produtores de gás	5,59	4,48	13
Anaeróbios	7,08	6,78	2
Desnitrificadores	8,1	5	1260
Celulolíticos aeróbios	5,85	5	7
Celulolíticos anaeróbios	3,95	3,48	3
Formadores de esporos	5,97	5,76	1,6
Azotobacter	<3,00	<3,00	-

À medida que se distancia da superfície da raiz, há um decréscimo quantitativo e qualitativo de microrganismos (Figura 3A), formando um gradiente que depende das propriedades químicas e físicas do solo e de fatores relacionados à planta, tais como a espécie, estado nutricional (Marschner, 1995) e fase de desenvolvimento. Conforme a planta se desenvolve e atinge maior atividade fisiológica (Figura 3B), maiores quantidade e diversidade de produtos são liberadas para a rizosfera, muitos dos quais são substratos para o crescimento microbiano (Brasil-Batista, 2003). Os efeitos desse aumento da atividade microbiana na rizosfera podem ser benéficos (ex.: fixação biológica do N<sub>2</sub>, micorrizas, biocontrole de patógenos, produção de substâncias promotoras de crescimento, imobilização temporária de nutrientes na biomassa) ou prejudiciais (ex.: patógenos, rizobactérias deletérias, competição por nutrientes com as plantas). Assim, é necessário entender os mecanismos pelos quais os microrganismos rizosféricos influenciam as plantas, para que se possam buscar tecnologias que otimizem suas ações benéficas e reduzam as prejudiciais às plantas (Bolton et al., 1992).

Os produtos depositados pelas plantas na rizosfera não constituem apenas fonte de C para o crescimento microbiano (Dakora & Phillips, 2002), mas têm várias funções (Tabela 3), como a de promover a quimiotaxia de microrganismos simbiotes, como é o caso dos flavonóides com relação às bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> nas raízes de leguminosas (Hungria, 1994) e aos fungos micorrízicos (Rengel, 2002b).

Sabe-se que as diminuições da nodulação em leguminosas expostas a alta disponibilidade de N e da colonização micorrízica em plantas sob alta disponibilidade de P estão relacionadas com alteração do padrão de exsudação de compostos orgânicos pelas raízes dessas plantas. Flavonóides produzidos por leguminosas induzem a transcrição dos genes *nod* nas bactérias fixadoras, o que desencadeia uma série de processos que levam à formação de nódulos e à fixação biológica do N<sub>2</sub>. Sob alta disponibilidade de N mineral no solo, há diminuição da exsudação desses indutores, o que leva à diminuição da nodulação (Hungria, 1994). No caso dos fungos micorrízicos, compostos orgânicos liberados pelas plantas na rizosfera funcionam como sinais da presença do hospedeiro para o simbiote. Essas moléculas pertencem ao mesmo grupo dos flavonóides envolvidos na sinalização para rizóbio. Nesse caso, eles atuam como indutores da germinação dos esporos ou da elongação das hifas (Tsai & Phillips, 1991).



**Figura 3.** A) Número de grupos microbianos morfologicamente distintos e número total de células determinado por Microscopia Eletrônica de Transmissão em seções ultrafinas de raízes de trevo (Adaptado de Foster, 1986). B) Número de microrganismos na rizosfera e matéria seca de plantas de milho de acordo com a idade da planta (Adaptado de Brasil-Batista, 2003).

### 3. Alterações Causadas por Microrganismos na Rizosfera

Se por um lado a comunidade microbiana da rizosfera é influenciada pelas plantas, por outro as plantas também são influenciadas por produtos do metabolismo microbiano. São diversas as maneiras pelas quais os microrganismos afetam a rizosfera: afetam a rizogênese, morfologia e estrutura das raízes; alteram a permeabilidade das células das raízes; alteram o metabolismo radicular; estimulam ou inibem a produção de determinados exsudatos; alteram a disponibilidade de nutrientes às plantas (Rovira & Davey, 1974).

Hormônios vegetais, tais como ácido indol acético (AIA), etileno e giberelinas (Lynch, 1986), são produzidos por bactérias que se estabelecem na rizosfera, onde se multiplicam e sobrevivem, obtendo vantagem competitiva sobre a pressão antagonística do restante da microbiota do solo. Essas rizobactérias podem ter efeito benéfico, nulo

ou prejudicial, sendo aquelas que propiciam efeito benéfico denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (Kloepper, 1996), dentre as quais estão *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium* (Luz, 1993). Plântulas de trigo possuem em sua rizosfera mais bactérias produtoras de AIA que plantas adultas, já que as adultas não mais necessitam de maiores quantidades desse hormônio para seu desenvolvimento. Com esse exemplo, sugere-se que as interações de plantas e microrganismos são reguladas por *feedback* positivo e negativo, de acordo com a necessidade de ambos (Andrade, 1999).

**Tabela 3.** Atuação dos produtos liberados pelas raízes na rizosfera (Compilado de Dakora & Phillips, 2002).

Composto liberado	Atuação na rizosfera
Fenólicos	fonte de nutrientes para microrganismos sinal quimioatrativo de microrganismos promotores de crescimento microbiano indutores de genes nod em rizóbio inibidores de genes nod em rizóbio indutores de resistência contra fitoalexinas quelantes de nutrientes de baixa solubilidade detoxificantes de Al fitoalexinas contra patógenos do solo
Ácidos orgânicos	fonte de nutrientes para microrganismos sinal quimioatrativo de microrganismos quelantes de nutrientes de baixa solubilidade acidificantes do solo detoxificantes de Al indutores de genes nod
Aminoácidos e fitosideróforos	fonte de nutrientes para microrganismos quelantes de nutrientes de baixa solubilidade sinal quimioatrativo de microrganismos
Vitaminas	promotores de crescimento microbiano e de plantas fonte de nutrientes
Purinas	fonte de nutrientes para microrganismos
Enzimas	liberação de P a partir de formas orgânicas catalisadores da transformação da matéria orgânica no solo
Células epidérmicas	produtoras de sinais que controlam mitose e expressão de genes indutoras do crescimento microbiano produzem quimioatrativos sintetizam moléculas de defesa atuam como iscas que mantêm o ápice radicular livre de infecções liberam mucilagem e proteínas

A presença de microrganismos na rizosfera pode aumentar a exsudação radiolar. Microrganismos simbióticos como o rizóbio e fungos micorrízicos aumentam quantitativa e qualitativamente a exsudação, o que parece lógico, visto que esses microrganismos influenciam diretamente o crescimento da planta e, portanto, sua fisiologia (Andrade, 1999). Barber & Martin (1976) observaram que 5-10% do C fixado pela planta foi exsudado pela rizosfera de cevada em condições estéreis, mas, quando microrganismos foram introduzidos, esse valor subiu para 12-18%, podendo haver aumento da ordem de 2 a 6 vezes na quantidade de C liberada na rizosfera de plantas cultivadas em condições não estéreis, dependendo da espécie de planta (Biondini et al., 1988). Da mesma forma, na rizosfera de trigo, os exsudatos radiculares praticamente dobraram na presença de *Pseudomonas putida* (Prikryl & Vancura, 1980). Os mecanismos de indução microbiana da exsudação radicular não são bem conhecidos, mas uma das possibilidades é que os microrganismos metabolizam rapidamente o C liberado, criando um gradiente de concentração que favoreceria novas exsudações. Outra hipótese seria de que os microrganismos danificariam fisicamente as células externas das raízes ou produziram hormônios ou metabólitos secundários que influenciariam a fisiologia da raiz (Bolton et al., 1992).

Resultados de Godo & Reisenauer (1980) esclareceram que os exsudatos radiculares de plantas de trigo crescendo em condições estéreis aumentaram a solubilidade do  $MnO$ . Esses resultados demonstram que a disponibilidade do  $Mn^{2+}$  na rizosfera também foi influenciada pela interação planta-microrganismos, o que afetou tanto os exsudatos radiculares, quanto as comunidades microbianas associadas.

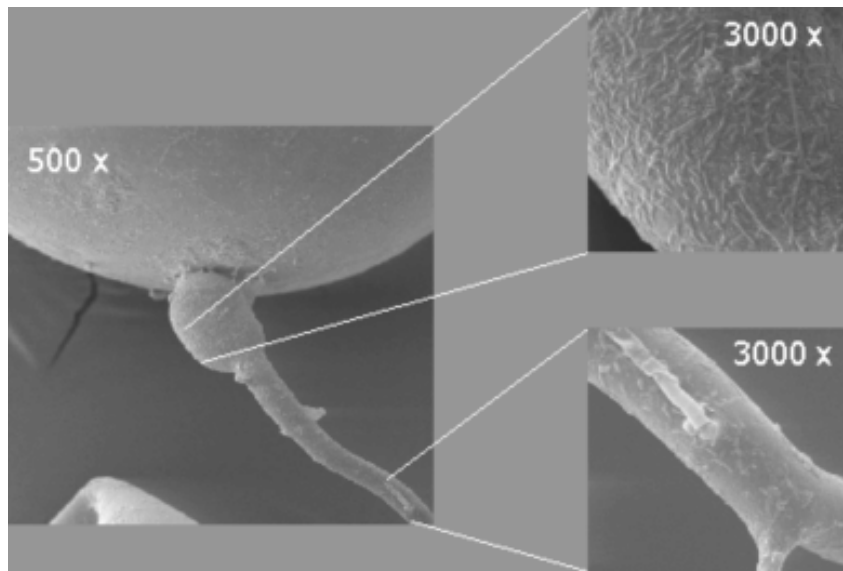
#### 4. Alterações Causadas por Fungos Micorrízicos na Rizosfera

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e microrganismos rizosféricos podem influenciar seu mútuo desenvolvimento e exercer efeitos combinados sobre o crescimento das plantas (Meyer & Linderman, 1986a,b). Segundo Kothari et al. (1990), os FMA alteram a liberação de compostos orgânicos pelas raízes das plantas que alteram a atividade microbiana da rizosfera. Kothari et al. (1991) observaram que a colonização de plantas de milho pelos FMAs diminuiu o potencial de redução do  $Mn^{4+}$  e a quantidade de  $Mn^{2+}$  na rizosfera. Embora a comunidade microbiana total tenha sido similar nas plantas micorrizadas e não micorrizadas, o número de microrganismos redutores de Mn diminuiu trinta vezes na rizosfera das plantas micorrizadas, indicando alterações na comunidade microbiana da rizosfera quando os FMAs estão presentes. Mudanças qualitativas na comunidade microbiana da rizosfera induzida pelos FMAs podem ocorrer por causa de efeitos indiretos na fisiologia do hospedeiro e mudanças na exsudação das raízes (Graham et al., 1981; Meyer & Linderman, 1986b; Arines et al., 1989) ou exsudatos fúngicos (Paulitz & Linderman, 1989). As hifas externas dos fungos micorrízicos também podem servir de substrato para o crescimento microbiano, sendo consumidas (Andrade, 1999) ou ainda os esporos podem ser parasitados, perdendo sua viabilidade (Siqueira et al., 1984).

A expressão “efeito micorrizosférico” é usada para caracterizar alterações do número de certos microrganismos causadas pela formação da micorriza. Outras

expressões são os chamados “efeito hifosférico” e “esporosférico”, referindo-se ao efeito das hifas e dos esporos dos FMAs, respectivamente, sobre a comunidade microbiana na sua proximidade. Enquanto alguns grupos são favorecidos pelos exsudatos dos fungos, outros são inibidos (Linderman, 1988). Kothari et al. (1990; 1991) atribuíram o aumento de microrganismos além da região rizosférica em plantas micorrizadas ao crescimento das hifas fúngicas além dos 5 mm da superfície radicular, o que pode ter propiciado substrato adicional (exsudatos e lisados de hifas) para o crescimento microbiano. As superfícies do micélio e dos esporos dos FMAs são colonizadas por bactérias e outros microrganismos (Figura 4) que crescem no material mucilaginoso que os recobre (Andrade et al., 1998; Nogueira, 2002). Andrade et al. (1997) demonstraram que diferentes espécies de FMAs do gênero *Glomus* são colonizadas por diferentes espécies de bactérias, tanto na micorrizosfera quanto na hifosfera, determinando-se ainda que algumas espécies bacterianas têm especificidade pela micorrizosfera, enquanto que outras preferem a hifosfera.

Assim como os FMAs influenciam a comunidade microbiana na rizosfera, o inverso também é verdadeiro. Certos microrganismos do solo produzem compostos que aumentam a permeabilidade das células das raízes (Barber & Martin, 1976), de forma que a exsudação também aumenta. No caso dos FMA, a maior presença de exsudatos radiculares pode estimular a produção de micélio na rizosfera (Tsai & Phillips, 1991), aumentando assim a colonização radicular pelo aumento da densidade de inóculo.



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando o crescimento microbiano sobre a superfície do bulbo basal e hifa do fungo micorrízico *Gigaspora rosea*. (Nogueira, 2002).

O estímulo dos exsudatos à colonização micorrízica pode ocorrer porque esses podem complexar produtos potencialmente inibidores, como o excesso de Mn e Zn (Hepper & Smith, 1976), podem degradar auto-inibidores produzidos pelos próprios FMAs (Watrud et al., 1978), ou ainda pela produção de fitohormônios, aminoácidos, vitaminas, etc. (Reid, 1992). Há relatos que certos isolados de *Bacillus* estimulam a colonização radicular pelos FMA (Aboul-Nasr, 1996), fato que pode alterar a eficiência da simbiose micorrízica. A presença de isolados de *Pseudomonas*, inibidora de fungos patogênicos, estimulou o crescimento de hifas de fungos micorrízicos (Vidal et al., 1996).

## 5. Rizodeposições e a Disponibilidade de Nutrientes

A disponibilidade e a mobilidade de íons metálicos no solo são diferentes das encontradas na região rizosférica. Isso ocorre porque na rizosfera os metais são complexados por agentes quelantes de origem vegetal (Tabela 3), o que aumenta sua solubilidade e mobilidade (Merckx et al., 1986). A deposição pelas raízes de diferentes moléculas na rizosfera é dependente do estado nutricional das plantas. Por exemplo, algumas espécies produzem ânions de ácidos orgânicos em resposta às deficiências de P e Fe, enquanto outras produzem fitossideróforos quando Fe e Zn são limitantes (Jones & Darrah, 1994). Um exemplo interessante é o caso da liberação de uma fitoalexina isoflavonóide pelas raízes de plantas de alfafa sob deficiência de Fe, a qual dissolve fosfatos de ferro, tornando Fe e P disponíveis às plantas. Já os exsudatos das plantas cultivadas sem suficiência de Fe não apresentavam essa capacidade de dissolução (Masaoka et al., 1993). Plantas de tomate deficientes em Fe também exsudam ácido caféico para solubilizar Fe de fontes insolúveis (Olsen et al., 1981). O mecanismo de ação desses fenólicos sobre a solubilização de P e Fe é que formam quelatos relativamente estáveis com os metais presentes nos fosfatos de Fe e Al, e, conseqüentemente, aumentam a disponibilidade de P e Fe para as plantas (Dakora & Phillips, 2002). Além disso, também ocorre solubilização de P por mudanças no pH, por deslocamento de P dos sítios de adsorção, e pela quelação de íons metálicos potencialmente reativos com fosfatos (Kirk, 2002). Plantas sob deficiência de fósforo também podem ter aumento da liberação de intermediários do Ciclo de Krebs para a rizosfera, como os ácidos cítrico e málico. Outros ácidos orgânicos (Tabela 1) também desempenham importante papel na mobilização de P, Fe e Mn. Por exemplo, plantas de alfafa sob deficiência de P tiveram aumento na exsudação de citrato da ordem de 82% (Lipton et al., 1987). Há diferenças entre espécies de plantas quanto à exsudação em resposta à deficiência de nutrientes. Por exemplo, o grão-de-bico produziu 11 e 24 vezes mais exsudatos que o feijão guandu e soja, respectivamente, enquanto que o amendoim produziu 8 e 17 vezes mais que essas espécies (Ohwaki & Hirata, 1992). Em solos ácidos, o P é indisponibilizado por ser complexado, geralmente, por hidróxidos de Fe e Al, enquanto que em solos alcalinos esses complexos ocorrem com Ca (Clarkson, 1985). Entretanto, o feijão guandu é eficiente em obter P nessas condições, possivelmente por intermédio do ácido piscídico, um forte quelante de Fe, permitindo a mobilização do fosfato (Ae et al., 1990). Lynch & Beebe (1995) observaram que variedades de feijoeiro mais adaptadas às condições de acidez do solo também liberavam mais  $H^+$  e ácidos orgânicos, o que aumentava a disponibilidade de P no

solo circunvizinho. Conforme Kirk (2002), a quelação por citrato é o mecanismo mais importante de mobilização de formas insolúveis de P, especialmente em solos altamente intemperizados, ricos em óxidos metálicos.

Deficiências de Fe e de Zn induzem a síntese de fitossideróforos no citoplasma, seguido por um aumento de sua liberação na rizosfera através da membrana plasmática. Na rizosfera os fitossideróforos formam complexos com formas férricas insolúveis, sendo inteiramente transportados para o citoplasma via transportadores específicos na membrana (Römheld, 1991). Sideróforos microbianos também são capazes de solubilizar compostos férricos na rizosfera, embora sejam menos absorvidos pelas plantas (Jurkevitch et al., 1986). Diferenças genotípicas determinam se uma determinada variedade é mais ou menos sensível à deficiência de Fe frente à quantidade de fitossideróforos que produz (Römheld & Marschner, 1990). Entretanto, essas moléculas orgânicas podem ser rapidamente degradadas pela ação microbiana na rizosfera. Interessantemente, a planta dispõe de mecanismos que visam suplantar esse aparente problema. Wirén et al. (1993) verificaram que no ápice das raízes de milho em crescimento o número de microrganismos rizosféricos é menor, o que pode ser parcialmente atribuído a antibióticos liberados nessa zona (Gochner et al., 1990). Por outro lado, os fitossideróforos são liberados principalmente na região apical (Marschner et al., 1987). Essa separação espacial entre microrganismos e local de liberação dos fitossideróforos ao longo das raízes seria uma importante estratégia para retardar a degradação microbiana de fitossideróforos, de modo que essas moléculas possam permanecer por mais tempo hábeis a complexar íons Fe. Além do mais, os quelantes complexados com metais parecem ser menos susceptíveis à degradação microbiana que os quelantes livres (Boudot et al., 1989).

Outra maneira pela qual as plantas obtêm nutrientes da região rizosférica é pela produção de enzimas extracelulares. No caso do fósforo, as formas orgânicas no solo estão contidas na biomassa microbiana e como fosfatos de inositol e fitatos (Clarkson, 1985). A baixa concentração de P nas raízes decorrente de sua deficiência induz a síntese de fosfatases ácidas intra e extracelulares (Duff et al., 1994), seguido por aumento da liberação de fosfatases extracelulares nos exsudatos radiculares. Além destas, fosfatases ácidas e alcalinas de origem fúngica e fosfatases alcalinas de origem bacteriana disponibilizam P inorgânico (Duff et al., 1994) pela hidrólise de fosfatos orgânicos monoésteres, que constitui de 30 a 80% do P total nos solos agrícolas (Gilbert et al., 1999). A importância da atividade dessas enzimas na disponibilidade de P às plantas foi evidenciada no trabalho de Tadano & Sakai (1991), em que plantas de trevo sob deficiência de P exsudaram cerca de 20 vezes mais fosfatase ácida de suas raízes em comparação com as de plantas cultivadas em níveis adequados de P. O ácido fítico constitui uma forma de P orgânico no solo que pode ser mineralizado pela ação de fitases (Duff et al., 1994). Li et al. (1997) observaram em diversas espécies de plantas que quanto maior o estresse causado pela deficiência de P maior era a liberação de fitases na rizosfera dessas plantas. Entretanto, Sinclair & Vadez (2002) questionam se as plantas realmente têm capacidade competitiva pelas formas orgânicas de P com os microrganismos da rizosfera. Segundo esses autores, um possível papel das fosfatases seria recuperar o P perdido na forma orgânica pelas rizodeposições.



Além do papel na aquisição de nutrientes pelas plantas, os exsudatos radiculares também podem ter potencial na fitorremediação e na tolerância a metais. Algumas espécies de plantas podem acumular metais pesados nas raízes e posteriormente eliminá-los na forma de exsudatos voláteis (De Souza et al., 1999), reduzindo sua concentração na rizosfera. Genótipos de plantas tolerantes ao excesso de Al exsudam ânions de ácidos orgânicos como mecanismo de proteção, como é o caso da exsudação de malato pelas raízes de trigo (Basu et al., 1994) e citrato pelas raízes de milho (Pellet et al., 1995), por complexar o excesso de Al. Essa exsudação dá-se principalmente na porção distal das raízes, já que as células novas nas pontas das raízes precisam ser protegidas do excesso de Al por um período relativamente curto, apenas o suficiente para que se tornem maduras e menos sensíveis ao Al (Basu et al., 1994).

A manipulação genética de plantas é uma ferramenta que pode ser utilizada para conferir às plantas capacidade de adaptação a ambientes adversos ou aumento da eficiência das associações microbianas na rizosfera por meio da alteração dos exsudatos radiculares. Por exemplo, o aumento da atividade da citrato sintase visando ao aumento da biossíntese e exsudação de citrato pode aumentar a tolerância ao excesso de Al e deficiência de P, uma vez que o citrato é eficiente não apenas em tornar indisponível o Al tóxico por quelação, mas também na solubilização de complexos insolúveis de P. A exsudação eficiente de substâncias orgânicas de interesse na rizosfera é dependente de três fatores: 1) seqüência de sinais bioquímicos que desencadeiem a síntese e exsudação da substância de interesse sob situações de estresse; 2) maquinaria bioquímica eficiente para a produção de quantidades relativamente elevadas dos compostos de interesse nas células das raízes; 3) transportadores de membrana que possibilitem a transferência dos compostos orgânicos dos seus sítios de produção para a rizosfera (Rengel, 2002a). A simples combinação desses três fatores numa mesma planta não necessariamente significa sucesso. O ideal é que esse mecanismo não seja expresso constitutivamente na planta, com dispêndio de quantidades significativas do C fixado, mas sim induzido sob condição de estresse, ou seja, toxicidade de Al ou deficiência de P. Assim, a planta também poderia utilizar mais eficientemente o C fixado, revertendo-o em produtividade.

## 6. PH na Rizosfera e Disponibilidade de Nutrientes

O fator mais importante referente à alteração do pH na rizosfera é o desbalanço na proporção entre cátions e ânions absorvidos pelas raízes e a correspondente extrusão de  $H^+$  e  $HCO_3^-$  (ou  $OH^-$ ), visando manter neutro o balanço de cargas (Marschner, 1995; Hinsinger et al., 2003). Se mais ânions são absorvidos em relação a cátions, maior será a extrusão de ânions  $HCO_3^-$  na rizosfera, resultando em aumento do pH. De modo contrário, se houver predominância de absorção de cátions, haverá maior extrusão de  $H^+$  e conseqüente acidificação (Dakora & Phillips, 2002).

A liberação de ácidos orgânicos na rizosfera (Tabela 1) também causa redução do pH, o que promove a solubilização de fosfatos (Jones & Darrah, 1994) e micronutrientes metálicos, os quais têm sua solubilidade aumentada à medida que o

pH decresce. Os ácidos orgânicos podem também ter origem microbiana, incrementada pela liberação de compostos orgânicos na região rizosférica, além da produção de  $\text{CO}_2$  pelas próprias raízes e pela atividade microbiana, o que também resulta em acidificação pela produção de ácido carbônico (Marschner, 1995; Hinsinger et al, 2003).

Como o nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, a forma na qual é absorvido é a grande determinante das mudanças do pH na rizosfera. Quando absorvido na forma de nitrato, as plantas o trocam por ânions, incluindo  $\text{OH}^-$ , o que causa aumento na disponibilidade de alguns nutrientes na rizosfera em solos ácidos. No caso de micronutrientes metálicos, o aumento de pH acima de 5,5 pode causar redução na disponibilidade. Sob condições de excesso de Zn, plantas que receberam  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram aumento de pH na rizosfera, o que conferiu proteção às plantas ao excesso de Zn (Li & Christie, 2001). Quando na forma amoniacal, a absorção do  $\text{N-NH}_4^+$  resulta na extrusão de  $\text{H}^+$  e acidificação da rizosfera. Nesse caso pode haver aumento nas disponibilidades de P, Fe, Cu, Mn e Zn e atingir níveis tóxicos, no caso dos metais. A fixação biológica de N em leguminosas também leva à extrusão de  $\text{H}^+$ , o que pode aumentar a disponibilidade de nutrientes necessários a esse processo, como o P, Mo e o Fe (Raven et al., 1990). Algumas plantas lançam mão de alguns mecanismos, ainda não totalmente compreendidos, para se adaptarem a condições de elevada acidez (pH 3-5), como é o caso de *Aspalathus linearis*, que modifica o pH de sua rizosfera pela extrusão de  $\text{OH}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  (Muofhe & Dakora, 2000). Isso aumenta a disponibilidade de alguns nutrientes, entre eles o N, pelo aumento da mineralização microbiana da matéria orgânica, favorecida nessa nova condição. Essa também pode ser uma estratégia usada para reduzir a toxicidade de Al, Fe e Mn, já que as formas tóxicas desses metais são precipitadas à medida que o pH aumenta.

## Referências

- ABOUL-NASR, A. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by *Bacillus micoides* on flax. Alex. **J. Agr. Res.**, v.41, p.261-270, 1996.
- AE, N. ARIHARA, J.; OKADA, K.; YOSIHARA, T.; JOHANSEN, C. Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. **Science**, v.248, p.477-480, 1990.
- ANDRADE, G. Interacciones microbianas en la rizosfera. In: SIQUIERA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIM, V.; FURTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Departamento de ciência do Solo, 1999. p. 551-575.
- ANDRADE, G.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant Soil**, v.202, p.79-87, 1998.

ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G. et al. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v.192, p.71-79, 1997.

ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental: organismos geneticamente modificados e grupos funcionais de microrganismos do solo. **Biotec. Ci. Desenv.**, v.34, p.11-19, 2005.

ARINES, J.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. **New Phytol.**, v.112, p.215-219, 1989.

BARBER, D.A.; MARTIN, J.K. The release of organic substances by cereal roots into soil. **New Phytol.**, v.76, p.69-80, 1976.

BASU, U.; GODBOLD, D.; TAYLOR, G. aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhance exudation of malate. **J. Plant Physiol.**, v.144, p.747-753, 1994.

BAZIN, M.J.; MARKHAM, P.; SCOTT, E.M.; LYNCH, J.M. Population dynamics and rhizosphere interactions. In: Lynch, J.M. (ed.) **The Rhizosphere**. New York: John Wiley, 1990. p. 99-127.

BIONDINI, M.; KLEIN, D.A.; REDENTE, E.F. Carbon and nitrogen losses through root exudation by *Agropiron cristatum*, *A. smithii*, and *Bouteloua gracilis*. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.477-482, 1988.

BOLTON, H.-JR.; FREDRICKSON, J.K.; ELLIOTT, L.F. Microbial ecology of the rhizosphere. In: METTING-JR., F.B. (ed.) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 27-63.

BOUDOT, J.P.; BRAHIM, A.B.H.; STEIMAN, RL; SEIGLE-MURANDI, F. Biodegradation of synthetic organo-metallic complexes of iron and aluminium with selected metal to carbon ratios. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, p.961-966, 1989.

BRASIL-BATISTA, C. Efeito do *Bacillus thuringiensis* sobre os grupos de microrganismos funcionais na rizosfera de milho e sorgo. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2003. 23 p. (Tese de Mestrado)

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

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-58.

CHENG, W.; COLEMAN, D.C. CARROLL, C.R.; HOFFMAN, C.A. In situ measurement of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.1189-1196, 1993.

CLARKSON, D.T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.36, p.77-115, 1985.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

DE SOUZA, M.P.; CHU, D.; ZHAO, M.; ZAYED, A.M.; RUZIN, S.E.; SCHICHNES, D.; TERRY, N. Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. **Plant Physiol.**, v.119, p. 565-573, 1999.

DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiol. Plant.**, v.90, p.791-800, 1994.

FOSTER, R.C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.24, p.211-234, 1986.

GILBERT, G.A.; KNIGHT, J.D.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P. Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. **Plant Cell Environ.**, v.22, p.801-810, 1999.

GOCHNAUER, M.B.; SEALEY, L.J.; McCULLY, M.E. Do detached root-cap cells influence bacteria associated with maize roots? **Plant Cell Environ.**, v.13, p.793-801, 1990.

GODO, G.H.; REISENAUER, H.M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.45, p.993-995, 1980.

GRAHAM, J.; LEONARD, R.; MENGE, J.A. Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus-inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiol.**, v.68, p.648-652, 1981.

GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; EBBLEWHITE, N.; DOBSON, G. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. **Soil Biol. Biochem.**, v.31, p.145-153, 1999.

HEPPER, C.M.; SMITH, G.A. Observation on the germination of *Endogone* spores. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.66, p.189-194, 1976.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arb. Deut. Landwirtsch. Ges.**, v.98, p.59-78, 1904.

HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. **Plant Soil**, v.248, p.43-59, 2003.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **R. bras. Ci. Solo**, v.18, p.339-364, 1994.

JONES, D.L.; DARRAH, P.R. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. **Plant Soil**, v.166, p.247-257, 1994.

JURKEVITCH, E.; HADAR, Y.; CHEN, Y. The remedy of lime-induced chlorosis in peanuts by *Pseudomonas* sp. siderophores. **J. Plant. Nutr.**, v.9, p.535-545, 1986.

KIRK, G.J.D. Modelling root-induced solubilization of nutrients. **Plant Soil**, v.255, p.49-57, 2002.

KLOEPPER, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **Bioscience**, v.46, p.406-409, 1996.

KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytol.**, v.116, p.637-645, 1990.

- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentration in maize (*Zea mays* L.). **New Phytol.**, v.117, p.649-655, 1991.
- LI, M.; OSAKI, M.; RAO, I.M.; TADANO, T. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus deficient conditions. **Plant Soil**, v.195, p.161-169, 1997.
- LI, X.; CHRISTIE, P. Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v.42, p.201-207, 2001.
- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopatol.**, v.78, p.366-371, 1988.
- LIPTON, D.S.; BLANCHARD, R.W.; BLEVINS, D.G. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. **Plant Physiol.**, v.85, p. 315-317, 1987.
- LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M. & PICININI, E.C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1993.
- LYNCH, J.M. Biotecnologia do solo: fatores microbiológicos na produtividade agrícola. São Paulo: Manole Ltda., 1986. 209 p.
- LYNCH, J.M.; BEEBE, S.E. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. **HortScience**, v.30, p.1165-1171, 1995.
- MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microb. Ecol.**, v.34, p.210-223, 1997.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2 ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; KISSEL, M. Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. **Physiol. Plant.**, v.71, p.157-162, 1987.
- MASAOKA, Y.; KOJIMA, M.; SUGIHARA, S.; YOSIHARA, T.; KOSHINO, M.; ICHIHARA, A. Dissolution of ferric phosphate by alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates. **Plant Soil**, v.155/156, p.75-78, 1993.
- MERCKX, R.; GINKEL, J.H.; SINNAEVE, J.; CREMERS, A. Plant induced changes in the rhizosphere of maize and wheat II. Complexation of cobalt, zinc and manganese in the rhizosphere of maize and wheat. **Plant Soil**, v.96, p.95-107, 1986.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*, **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.185-190, 1986a.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.191-196, 1986b.
- MUOFHE, M.L.; DAKORA, F.D. Modification of rhizosphere pH by the symbiotic legume *Aspalathus linearis* growing in a sandy acidic soil. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.27, p.1169-1173, 2000.

NOGUEIRA, M.A. Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. Piracicaba, Universidade de São Paulo. 2002. 195 p. (Tese de Doutorado)

OHWAKI, Y.; HIRATA, H. Differences in carboxylic acid exudation among P-starved leguminous crops in relation to carboxylic acid contents in plant tissues and phospholipid level in roots. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.38, p.235-243, 1992.

OLSEN, R.A.; BENNETT, J.H.; BLUME, D.; BROWN, J.C. Chemical aspects of the Fe stress response mechanism in tomatoes. **J. Plant. Nutr.**, v.3, p.905-921, 1981.

PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v.113, p.37-45, 1989.

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.196, p.788-795, 1995.

PRIKRYL, Z.; VANCURA, V. Root exudates of plants VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. **Plant Soil**, v.57, p.69-83, 1980.

RAVEN, J.A.; FRANCO, A.A.; DE JESUS, E.L.; JACOB-NETO, J. H<sup>+</sup> extrusion and organic-acid synthesis in N<sub>2</sub>-fixing symbioses involving vascular plants. **New Phytol.**, v.114, p.369-389, 1990.

REID, C.P.P. Mycorrhizas. In: METTING-JR., F.B. (ed.) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 281-315.

RENGEL, Z. Genetic control of root exudation. **Plant Soil**, v.245, p.59-70, 2002a.

RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant Soil**, v.245, p.147-162, 2002b.

RENGEL, Z. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. **Plant Soil**, v.196, p.255-260, 1997.

RÖMHELD, V. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. **Plant Soil**, v.130, p.127-134, 1991.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. **Plant Soil**, v.123, p.147-153, 1990.

ROVIRA, A.D.; DAVEY, C.B. Biology of the rhizosphere. In: CARSON, E.W. (ed.) **The plant root and its environment**. Charlottesville: Virginia Press, 1974. p. 153-204.

SINCLAIR, T.R.; VADEZ, V. Physiological traits for crop yield improvement in low N and P environments. **Plant Soil**, v.245, p.1-15, 2002.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; KIMBROUGH, J.W.; SHENCK, N.C. *Stachybotrys chartarum* antagonistic to azygospores of *Gigaspora margarita* in vitro. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.679-681, 1984.

TADANO, T.; SAKAI, H. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.37, p. 129-140, 1991.

TSAI, S.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.1485-1488, 1991.

VIDAL, M.T.; ANDRADE, G.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Comparative effect of *Pseudomonas*, Strain F113 [Biocontrol Agent (Antifungal)] and its isogenic mutant, Strain F113G22 [impaired biocontrol ability] on spore germination and mycelial growth of *Glomus mosseae* under monoxenic conditions. In: AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. (Eds.). Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAS, 4., Granada, 1994. Proceedings. Luxemburg: European Commission Report, 1996, p. 673-676.

WATRUD, L.S.; HEITHAUS, J.J.; JAWORSKI, E.G. Geotropism in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Mycologia**, v.70, p.449-452, 1978.

WIRÉN, N. VON; RÖMHELD, V.; MOREL, J.L.; GUCKERT, A.; MARSHNER, H. Influence of microorganisms on iron acquisition in maize. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.371-376, 1993.

# Capítulo 6

## Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-leguminosas

Valéria Marino Rodrigues **SALA** <sup>(1)</sup>, Adriana Parada Dias da **SILVEIRA** <sup>(2)</sup>  
e Elke Jurandy Bran Nogueira **CARDOSO** <sup>(3)</sup>

### 1. Introdução

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera, porém indisponível às plantas, devido à grande estabilidade da molécula, o que torna necessária sua adição ao solo pelo uso de fertilizantes. Principalmente nos países de clima tropical, a agricultura é mais dependente do emprego de fertilizantes nitrogenados, pois devido à grande quantidade de chuvas e à rápida decomposição da matéria orgânica, grande parte do N é perdida via lixiviação, desnitrificação e pela imobilização microbiana. Portanto, é de extrema importância a nutrição equilibrada aliada a práticas culturais que visem um sistema de controle integrado, minimizando os gastos com adubação, tornando a agricultura economicamente viável e mais competitiva, reduzindo as perdas e a poluição ambiental.

O Nitrogênio é o macronutriente mais limitante para produtividade das culturas e representa um dos mais altos custos para o agricultor. Uma vez que, no Brasil, o fertilizante não é subsidiado, a maioria dos genótipos de planta utilizados comercialmente foi selecionada para obtenção de alta produtividade em condições de baixo nível de N no solo, favorecendo, mesmo que indiretamente, a seleção de variedades que são capazes de suprir parte das suas necessidades de N pela associação com bactérias diazotróficas (Döbereiner, 1997).

A partir das observações pioneiras de Döbereiner e Day (1976) de que o uso de meios semi-sólidos, sem N, é a condição ideal para o isolamento de diazotróficos "in vitro", pois são microaerófilos quando não supridos com N mineral, esse método tem sido empregado extensivamente no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores associados a diferentes plantas e condições de clima e solo.

---

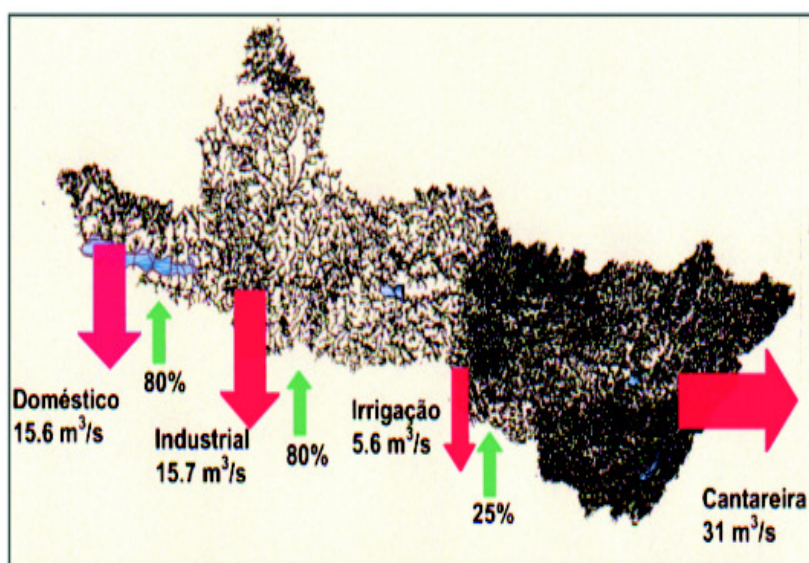
<sup>(1)</sup> Pós-doutoranda, Instituto Agronômico, Centro de Solos e Recursos Ambientais, Caixa Postal 28, CEP- 13001-970, Campinas, SP. E-mail: valeriamarino@uol.com.br

<sup>(2)</sup> Pesquisadora, Instituto Agronômico, Centro de Solos e Recursos Ambientais. E-mail: apdsil@iac.sp.gov.br

<sup>(3)</sup> Professora titular, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Ciência do Solo. Caixa Postal- 09, CEP -13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: ejbncard@esalq.usp.br



Observou-se que tais diazotróficos ocupam preferencialmente sítios onde a concentração de  $O_2$  é limitada (Figura 1), aonde a taxa de difusão do  $O_2$  é igual à taxa de respiração, não acumulando oxigênio suficiente para inativação da nitrogenase (Döbereiner et al, 1995). Essa descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica do nitrogênio nas associações entre diazotróficos e não leguminosas, denominadas comumente de fixação de  $N_2$  associativa (Baldani et al., 1997).



**Figura 1.** Cultura “in vitro” com a inoculação de bactéria diazotrófica associativa, com a formação de película característica em meio semi-sólido e sem adição de N.

Observou-se que importantes culturas agrícolas como a cana-de-açúcar, alguns cereais e gramíneas forrageiras poderiam obter N da sua fixação biológica. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, também, o maior exportador de açúcar e etanol (Macedo, 2007). Principalmente com o crescente interesse na produção de biocombustíveis, com aumento da produção de carros com a tecnologia “flex” e das metas estabelecidas no Protocolo de Kyoto, a área cultivada com cana-de-açúcar tem crescido no país. Já, os cereais são a base alimentar da população humana e ocupam aproximadamente cinco vezes a área ocupada por leguminosas. É estimado que somente as culturas do trigo, milho e arroz consomem aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (Ladha et al., 2005).

Assim, a pesquisa sobre as bactérias associadas a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte das suas necessidades de N possa ser suprida pelas bactérias diazotróficas.

## 2. Conceito e Disseminação

A maior limitação para a fixação biológica do nitrogênio (FBN) em sistemas não simbióticos é a disponibilidade de fontes de carbono para a bactéria e, conseqüentemente, para obtenção de energia, uma vez que o processo demanda grande quantidade de ATP. Essa limitação tenta ser compensada pelo diazotrófico com a sua localização mais próxima da planta, ou seja, ao redor ou dentro das raízes, como endófitos (Tilak et al, 2005).

Assim, as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (Baldani et al., 1997). Na primeira categoria estão todas as espécies que colonizam as raízes superficialmente. Os microrganismos endofíticos facultativos são aqueles capazes de colonizar raízes interna e externamente e o terceiro grupo, tido como de maior importância, os que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea das plantas não leguminosas.

A denominação de “bactéria endofítica”, comumente empregada, vem do fato de serem capazes de viver no interior da planta sem que, no entanto, induzam uma resposta de defesa à sua presença (Petrini, 1991). Essa definição inclui bactérias endofíticas simbióticas, assim como associativas, e ainda, bactérias que são endófitas em apenas alguma fase do seu ciclo de vida, transitando entre colonização rizosférica e endofítica (Hallmann et al., 1997).

Essa definição de bactéria endofítica proposta por Petrini (1991) e a divisão em grupos por categoria de acordo com sua localização devem ser empregadas com cautela, uma vez que muita pesquisa ainda é necessária para esclarecer os diferentes modos de atuação dessas bactérias na planta hospedeira e do seu habitat durante seu ciclo de vida.

Já foi amplamente demonstrado que bactérias pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* têm pouca sobrevivência no solo, sendo denominadas de endofíticas obrigatórias (Baldani et al., 1997). Entretanto, a classificação de acordo com o habitat pode inferir em erros. Algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras, apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Existem relatos de respostas positivas à inoculação de vários gêneros e espécies de bactérias endofíticas (Dalla Santa et al., 2004; Roesch et al., 2005), ausência de resposta da planta à inoculação (Ogüt et al., 2005) e mesmo de efeitos negativos (Canuto et al., 2003), dependendo da espécie vegetal, do genótipo, das condições nutricionais, assim como de fatores abióticos do meio ambiente.

Assim, Kloepper et al. (1992) propuseram uma definição mais abrangente, ou seja, que bactérias endofíticas são aquelas que estão localizadas dentro dos tecidos vegetais, interiormente à epiderme. Porém, não fizeram distinção entre bactérias patogênicas e não patogênicas, sendo justificado pelo fato de que bactérias encontradas dentro de plantas aparentemente saudáveis podem ser patogênicas dependendo da região geográfica.

Por exemplo, a bactéria endofítica *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, antiga *Pseudomonas rubrisubalbicans*, foi descrita como agente causal da estria mosqueada da cana-de-açúcar, e, mais tarde, encontrada em variedades de sorgo causando a doença da estria vermelha. Entretanto, não houve sintomas da doença em variedades brasileiras de sorgo e nos campos de cana-de-açúcar, sendo que todos os cultivares testados se mostraram resistentes a essa bactéria (Olivares et al., 1997). Portanto, existe uma linha muito tênue dividindo bactérias associativas benéficas, neutras e patogênicas.

Diferentes métodos de desinfestação superficial de tecidos de planta têm sido empregados para obtenção de isolados de bactérias endofíticas (Döbereiner et al., 1995; McInroy & Kloepper, 1995; Stoltzfus et al., 1997; Araújo et al., 2001). Com o emprego de técnicas moleculares, novas espécies estão sendo descritas como endófitas associadas a diferentes espécies vegetais, inclusive espécies de bactérias que dificilmente poderiam ser identificadas pelos métodos tradicionais de isolamento, por estarem presentes dentro dos tecidos vegetais em número reduzido de células. As bactérias endofíticas benéficas ou neutras são encontradas em menor número, variando de  $10^3$  a  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> tecido fresco, principalmente quando introduzidas com a inoculação, enquanto que as patogênicas geralmente estão presentes em grande número no interior da planta hospedeira, apresentando uma colonização de aproximadamente  $10^7$  a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> tecido fresco (Lodewyckx et al., 2002).

Geralmente, são encontradas em maior número nas raízes, decrescendo progressivamente do caule às folhas (Lamb et al., 1996; Gomes et al., 2005), o que demonstra que as raízes são a principal “porta de entrada” dessas bactérias, as quais conseguem penetrar pelos locais que foram danificados naturalmente devido ao próprio crescimento da planta, ou ainda, nas junções das raízes primárias com as secundárias ou nos pêlos radiculares. Nas últimas duas situações, a bactéria produz enzimas capazes de degradar as paredes celulares da planta hospedeira, como celulasas e pectinases (Hallmann et al., 1997).

Entretanto, também podem ser disseminadas via semente ou por alguma parte da planta, como a cana-de-açúcar que é multiplicada por propagação vegetativa (James & Olivares, 1997).

A transmissão de bactérias diazotróficas para plantas também pode estar relacionada à presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), como demonstrado por Varma et al. (1981), Paula et al. (1990, 1991, 1993) e Li & Strzelczyk (2000). A bactéria está presente nos esporos desses fungos, mas ainda se desconhece sua função. No processo de penetração das hifas infectivas, pode ocorrer maior exsudação de nutrientes pela planta, acelerando o crescimento de tais bactérias (Paula et al., 1991). Provavelmente deve existir uma interação funcional entre as bactérias endofíticas e os FMAs (Paula et al., 1992). Plantas dependentes da fixação biológica de N<sub>2</sub> geralmente possuem maior demanda de P do que as plantas que recebem fertilizante nitrogenado, pois existe um aumento no consumo de ATP para o funcionamento da nitrogenase, além do necessário para transdução de sinais entre a planta e os microrganismos (Graham & Vance, 2000). Os rizóbios ficam separados dos FMAs, devido à fixação do N dentro dos nódulos, e geralmente não ocorre competição entre esses

microrganismos. Já as bactérias diazotróficas associativas não estão separadas dos FMAs (Bandara et al., 2006), podendo resultar em competição por nutrientes e espaço entre os dois microrganismos, ou ainda, em sinergismo, proporcionando benefícios para planta hospedeira.

### 3. Interação Planta-Bactéria

As bactérias diazotróficas endofíticas são favorecidas porque o interior da planta representa um hábitat mais protegido de outros microrganismos, além do maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (Gyaneshwar et al., 2001; Baldani & Baldani, 2005).

Em condições de campo, principalmente quando a bactéria é introduzida com a inoculação, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas, uma vez que precisam competir com os microrganismos nativos já existentes no solo (Baldani et al., 1986). Assim, as respostas à inoculação são mais pronunciadas em solos esterilizados (Saubidet et al., 2002), arenosos (Merten & Hess, 1984) ou em países aonde as populações naturais dessas bactérias são muito baixas, como em Israel (Okon, 1985).

A comunidade microbiana endofítica, entretanto, possui uma estrutura dinâmica que é influenciada por fatores bióticos e abióticos, sendo que a planta é o principal fator na associação planta-bactéria (Halmann et al., 1997). Em uma primeira fase, as bactérias diazotróficas endofíticas, ainda não associadas a planta hospedeira, são selecionadas pelos substratos disponibilizados pela planta, ou seja, os produtos da rizodeposição, como exsudatos e lisados, que são utilizados como fonte de energia. Essa fase é essencial para a multiplicação e o estabelecimento da bactéria na rizosfera. Quando já estabelecidas como endófitas, as bactérias são ainda mais dependentes das fontes de carbono disponibilizadas pela planta.

Estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecerem nas raízes da mesma espécie vegetal, após inoculação, sendo denominadas de estirpes homólogas (Baldani & Baldani, 2005). Pesaro & Widner (2006) demonstraram que as populações de bactérias promotoras de crescimento pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, no solo, sob uma cultura de trigo, diferiram das populações encontradas sob uma cultura de trevo. Também, Germida et al. (1998) observaram que os grupos de bactérias encontrados dentro das raízes de plantas de canola não ocorriam nas plantas de trigo cultivadas na mesma localidade, demonstrando que as populações de bactérias endofíticas são fortemente dependentes da planta hospedeira.

Existe um consenso geral de que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas (Reis et al., 2000). Miranda et al. (1990), utilizando 24 genótipos de *Panicum maximum*, demonstraram que as plantas diferiam quanto à capacidade de obter N pela fixação biológica, provavelmente, devido a diferenças dos genótipos na capacidade de associação com bactérias diazotróficas. Bhattarai & Hess (1998) também observaram que diferentes genótipos de trigo diferiram quanto ao aumento de produtividade propiciado por isolados de bactérias do gênero *Azospirillum* e que os maiores benefícios foram obtidos com genótipo e bactéria oriundos da mesma localidade.

Já foi demonstrado por Antonyuk & Evseeva (2006) que as lectinas produzidas por plantas de trigo, excretadas pelas raízes, atuam como sinais moleculares para associação com bactérias do gênero *Azospirillum* e são fundamentais para determinar a especificidade genotípica da interação planta-bactéria.

Alguns trabalhos têm demonstrado efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas não homólogas, ou seja, que foram originalmente isoladas de outra espécie vegetal. Iniguez et al. (2004) constataram que um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, originalmente isolado de plantas de milho, foi observado no interior das raízes de plantas de trigo, suprimindo suas necessidades de N. Também, Njoloma et al. (2006) observaram que uma estirpe de *Herbaspirillum* sp., a qual foi obtida de plantas de arroz, pode colonizar como endófito plantas de cana-de-açúcar, porém, não avaliaram os possíveis benefícios para essa cultura.

Existem também relatos positivos da inoculação de isolados homólogos em genótipo da mesma espécie de planta diferente do qual foram originalmente obtidos. Sala (2007) observou que bactérias diazotróficas não apresentaram especificidade ao nível de genótipo, uma vez que foram obtidos de raízes de trigo do genótipo ITD-19 (*Triticum durum*) e os maiores aumentos na produtividade, devido à inoculação, foram observados nas plantas do genótipo IAC-370 (*Triticum aestivum hard*), sendo que esse efeito pode ser constatado em três experimentos de campo (Sala et al., 2007).

#### 4. Diversidade

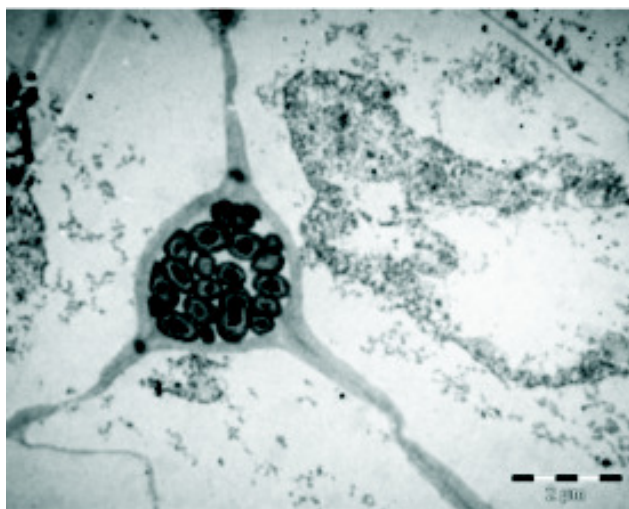
Muitos gêneros de bactérias estão sendo isolados de plantas desinfetadas superficialmente, demonstrando a diversidade da microbiota endofítica. Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias foram identificadas e caracterizadas.

A diversidade da comunidade endofítica em plantas de trigo, ao contrário da comunidade rizosférica, é maior nos cultivares modernos, melhorados geneticamente, comparados aos cultivares antigos ou selvagens (Germida & Siciliano, 2001). Isso sugere uma adaptação da microbiota, e/ou, uma maior especificidade planta-bactéria, o que torna de extrema importância a pesquisa de novas bactérias endofíticas associativas.

Atualmente, está sendo demonstrado que algumas bactérias, já descritas anteriormente, também são capazes de colonizar o interior das raízes de outras culturas, como por exemplo, *Bulkholderia vietnamiensis* encontrada em plantas de milho (Caballero-Melado et al., 2001) e de cana-de-açúcar (Govindarajan et al., 2006), *Serratia marcescens*, isolada de raízes de plantas de arroz (Gyaneshwar et al., 2001), e *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*, em plantas de trigo (Sala, 2007). Além disso, novas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas estão sendo descritas, como *Herbaspirillum hiltneri*, isolado de plantas de trigo (Rothballer et al., 2006) entre outras.

## 5. Colonização

Uma vez dentro da planta, as bactérias diazotróficas endofíticas estão localizadas principalmente nos espaços intercelulares (Figura 2), entre as células do córtex das raízes, na região de alongamento, entretanto algumas bactérias também podem colonizar as plantas intracelularmente, estando presentes nas células do córtex e com menor frequência nos vasos condutores do xilema.



**Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*. Presença da bactéria no espaço intercelular das células do córtex. A barra representa 2  $\mu$ m.

Ainda não está esclarecido se a presença da bactéria nos tecidos vasculares tem somente a função de transportá-la para outras partes da planta ou se, realmente, a bactéria vive e se multiplica dentro dos vasos condutores (Hallmann et al., 1997).

A localização da bactéria dentro da planta é muito dependente da associação planta-bactéria, sugerindo especificidade dessa interação. Algumas bactérias estão restritas aos vasos do xilema. James et al. (1997) demonstraram que, nas folhas de plantas de sorgo, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* não estão presentes nos espaços intercelulares, mas somente localizados nos vasos do xilema. Entretanto, *Herbaspirillum seropedicae* não foi encontrado colonizando folhas de cana-de-açúcar, mas somente *H. rubrisubalbicans*, que estava presente nos espaços intercelulares e nos vasos do xilema (Olivares et al., 1997).

Em plantas de cana-de-açúcar, Dong et al. (1994) observaram que a colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* ocorre nos espaços intercelulares, que são ricos em sucrose e com pH ácido, sugerindo que a localização da bactéria na planta está relacionada ao seu requerimento nutricional, pois *Gluconacetobacter* cresce e fixa N<sub>2</sub> quando cultivado com sucrose como fonte de carbono e em baixos valores de pH. Entretanto, James et al. (2001) demonstraram que a colonização por *G. diazotrophicus* ocorre nos espaços intercelulares e também nos vasos do xilema.

Muitas técnicas estão sendo utilizadas com o objetivo de estudar a localização dessas bactérias, principalmente as que fazem a marcação da bactéria inoculada, como utilização de soros monoclonais ou policlonais; imunofluorescência; emprego de genes marcadores, denominados de genes repórteres, como "lacZ" ou "GUS"; proteínas fluorescentes, como a "GFP", ou sondas moleculares espécie-específicas. Essas técnicas são importantes para melhor elucidar os mecanismos de interação planta-bactéria diazotrófica endofítica.

## 6. Efeitos Benéficos

Com o emprego do isótopo estável  $^{15}\text{N}$  ficou demonstrado que muitas plantas, não leguminosas, especialmente gramíneas, podem satisfazer parte das suas necessidades de N pela fixação biológica desse elemento.

Principalmente no Brasil, a cultura da cana-de-açúcar responde muito pouco à adição de fertilizantes nitrogenados, sugerindo que pode obter grande parte do N requerido pela FBN. Foi demonstrado por Urquiaga et al. (1992) que 60 a 70% do N acumulado em algumas variedades de cana-de-açúcar foram provenientes da FBN.

Observou-se que plantas não leguminosas apresentavam atividade de redução de acetileno, sendo mais tarde constatado que as bactérias associadas a essas plantas possuíam os genes requeridos para expressão da nitrogenase, e ainda, que ocorria a expressão "in situ" dessa enzima na associação planta-bactéria diazotrófica (James, 2000). Todavia, como os produtos da FBN são transferidos para a planta hospedeira ainda não está totalmente elucidado.

Nas associações simbióticas, como nas plantas leguminosas e rizóbios, onde há uma estrutura definida, o nódulo, já foi demonstrado que os produtos derivados FBN são transferidos para a planta hospedeira, e por sua vez, as necessidades de fontes de carbono da bactéria são supridas pelos compostos fotossintetizados disponibilizados pela planta.

Possivelmente, nas associações bactéria endofítica - planta não leguminosa, a condição de baixa pressão de  $\text{O}_2$ , essencial para o funcionamento da nitrogenase e, conseqüentemente, para a FBN, pode ser obtida com a alta taxa de respiração da bactéria e/ou nos vasos do xilema, onde há baixa pressão de  $\text{O}_2$  (James et al., 1997). No entanto, alta concentração de bactérias associadas ou no interior da planta não significa alta expressão da nitrogenase. Nesse caso, a morte e subsequente mineralização do diazotrófico podem liberar quantidades significativas do N fixado, mas esse processo é ineficiente, e provavelmente tardio, quando comparado à imediata liberação de produtos da fixação do  $\text{N}_2$  por bactérias vivas, como ocorre nos nódulos de plantas leguminosas (James, 2000). Além disso, nenhum diazotrófico endofítico associado à cana-de-açúcar ou a outras gramíneas foi encontrado dentro de células vivas do hospedeiro (Reis et al., 2000), e ainda não foi demonstrado que existe correlação entre o número de bactérias diazotróficas endofíticas e a quantidade de N fixado via FBN. Além do mais, pode ser somente uma extensão da relação solo - comunidade bacteriana rizosférica, a qual possui vantagens de um habitat protegido que o interior da planta pode propiciar.

Assim, Iniguez et al. (2004) propõem que alguns critérios precisam ser preenchidos com o objetivo de demonstrar que a bactéria inoculada é capaz de satisfazer a demanda de N de uma planta via FBN: 1. a planta deve apresentar aumento no teor de N; 2. a planta não deve apresentar sintomas de deficiência de N na ausência desse elemento; 3. deve-se empregar  $^{15}\text{N}$ , ou seja, marcação isotópica, para provar que o N encontrado na planta é oriundo da atmosfera; 4. o nitrogênio fixado deve ser incorporado na planta em seus metabólitos ou proteínas; 5. todos esses efeitos não podem ser observados nas plantas que não receberam inóculo, ou utilizando mutantes Nif negativos como inóculo. Ainda, para preencher o postulado de Koch, a bactéria inoculada deve ser re-isolada da planta hospedeira.

Os mesmos autores demonstraram que uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* (KB342) satisfazia todos esses critérios quando associada a plantas de trigo do genótipo Trenton, o que, entretanto, não foi observado em dois outros genótipos. As plantas apresentaram em média 40% do N total derivado da FBN, e ainda, conseguiram absorver em média 70% do N contido no substrato, enquanto que as plantas da testemunha somente absorveram 20%. Isso sugeriu que devido à maior quantidade de N disponibilizada via FBN, as plantas associadas a essa bactéria apresentaram maior crescimento radicular, o que proporcionou maior absorção de N do solo.

Tratando-se de bactérias diazotróficas, acreditava-se que a fixação de  $\text{N}_2$  e a liberação de parte do nitrogênio fixado para a planta fossem os principais modos de ação sobre o hospedeiro. No entanto, existem muitos trabalhos que relatam aumento no crescimento radicular propiciado pela inoculação sem que esse efeito possa ser atribuído à FBN (Kapulnik et al., 1985), mas provavelmente, à produção de fitormônios pela bactéria. Sevilla et al. (2001) comparando uma estirpe de *Gluconacetobacter* com uma mutante Nif negativa, concluíram que outros fatores, não somente a FBN, poderiam ser responsáveis pelos benefícios proporcionados pela inoculação.

Geralmente, essas bactérias não conseguem suprir totalmente a demanda de N das plantas somente pela FBN, como acontece com os rizóbios para a cultura da soja. Porém, podem influenciar fortemente a nutrição nitrogenada das culturas as quais estão associadas, aumentando a capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o aumento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N das plantas (Mantelin & Touraine, 2004).

As pesquisas realizadas sugerem que a inoculação, portanto, não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível (Saubidet et al., 2002). Existem muitos relatos dos benefícios propiciados pela inoculação com a adição de fertilizante nitrogenado (Didonet et al., 1996; 2000), inclusive de Dalla Santa et al. (2004) e Mahboob & Asghar (2002), que obtiveram aumento da produtividade de trigo com a inoculação nos tratamentos com 100% do N recomendado.

Parece evidente que múltiplos mecanismos estão interagindo para obtenção dos benefícios propiciados às plantas às quais estas bactérias estão associadas. Assim sendo, bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas poderiam ser classificadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), uma vez que são capazes de promover benefícios às plantas, não exclusivamente pela FBN.



As bactérias diazotróficas mais estudadas como BPCPs associativas, ou seja, que não formam simbiose com a planta hospedeira, são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (Bashan & de-Bashan, 2005), que foram identificadas inicialmente como *Spirillum lipoferum* por Döbereiner & Day (1976), isolada de raízes de *Digitaria*. Posteriormente, foi proposto o gênero *Azospirillum* com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasiliense*. Atualmente, muitas outras espécies foram descritas como *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), isolada de gramíneas forrageiras e pupunha nativa da região Amazônica, *A. halopraeferans* (Reinhold et al., 1987), isolada de gramíneas do Paquistão, *A. irakense* (Khammas et al., 1989) isolada de arroz no Iraque, *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001) isolada da gramínea *Miscanthus*, entre outras.

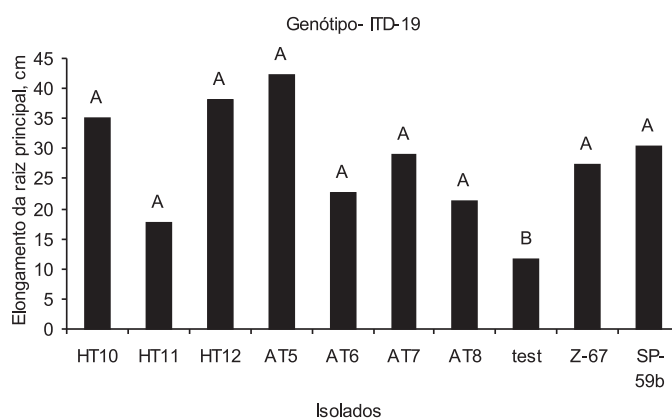
Foram observadas várias modificações na morfologia das raízes das plantas devido à inoculação de isolados de *Azospirillum* spp., como aumento em número, comprimento, área e aumento na absorção mineral, que podem estar relacionadas a substâncias promotoras de crescimento secretadas pela bactéria (Martin et al., 1989, Roesch et al., 2005). Bhattarai & Hess (1998) concluíram que, ao lado da FBN, o efeito de estimulação do crescimento pela bactéria no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de crescimento da planta, pode ser responsável pelo impacto positivo da inoculação.

Observou-se que isolados de bactérias diazotróficas, obtidos de raízes de trigo desinfestadas superficialmente, promoveram aumento no crescimento nas raízes de plantas de trigo (Figura 3) (Sala et al., 2005). Foi demonstrado que o aumento das raízes propiciado pelos isolados de *Azospirillum brasiliense* (IAC-AT-8), *Achromobacter insolitus* (IAC-HT-11) e *Zoogloea ramigera* (IAC-HT-12) ocorreu independentemente da dose de N empregada, observando-se uma maior quantidade de raízes laterais na presença dos isolados empregados (Figura 4) (Sala, 2007).

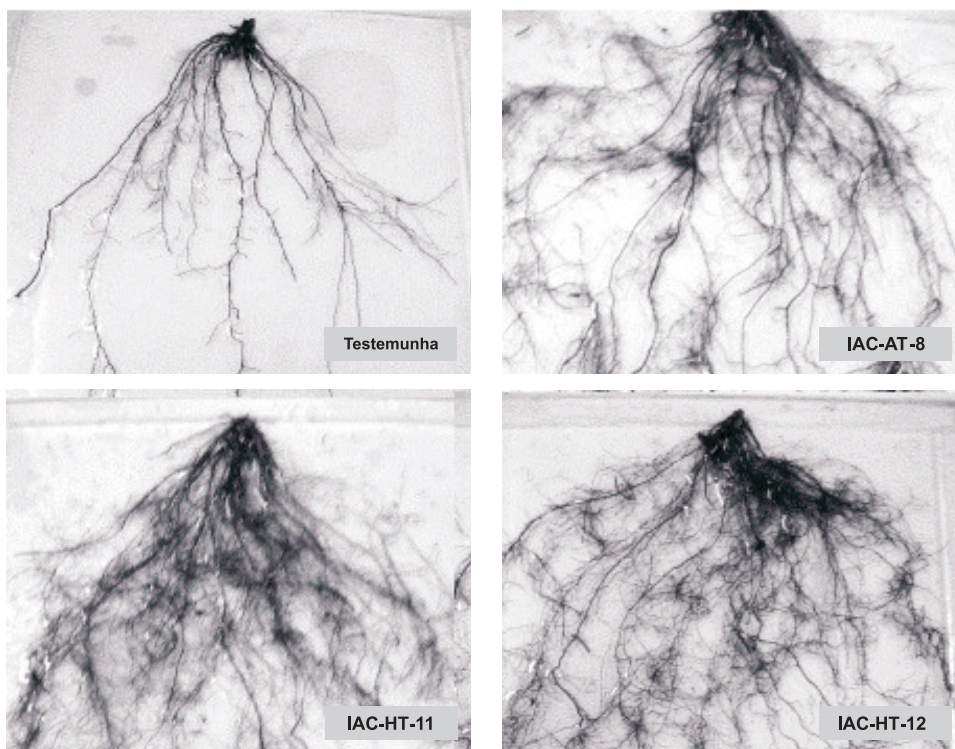
Segundo Mantelin & Touraine (2004), a absorção de N e a estrutura das raízes das plantas são influenciadas por BPCPs, assim como pela disponibilidade de N do ambiente. O efeito causado por essas bactérias na absorção de N e no desenvolvimento das raízes é similar ao observado em situação de baixa disponibilidade de N, ou seja, aumento do desenvolvimento de raízes laterais e estimulação da absorção de N.

Já foi demonstrado que isolados do gênero *Azospirillum* podem sintetizar auxinas, citoquininas e giberelinas (Bashan et al., 2004). As auxinas são os fitormônios mais comumente sintetizados por diversos grupos de microrganismos, sendo que o principal é o ácido indol acético (AIA), o qual, inclusive, também já foi observado em cultura pura de células de isolados de bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* (Tsavkelova et al., 2006).

Entretanto, a capacidade de BPCPs de produzir altas concentrações de indóis "in vitro" não é necessariamente um pré-requisito para que ocorra aumento de crescimento e de produção das plantas na presença de tais bactérias, pois o efeito benéfico depende de sua concentração. Os fitormônios estimulam o crescimento das raízes em baixas concentrações, porém, causam efeito inibitório em altas, sugerindo que a inoculação com grande número de células bacterianas viáveis pode causar inibição, ao invés de estimular o crescimento das raízes (Dobbelaere et al., 2002).



**Figura 3.** Comprimento da raiz principal do genótipo de trigo ITD-19 submetido a diferentes isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em relação à testemunha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5%. Z-67: estirpe tipo de *Herbaspirillum seropedicae* e SP-59b: estirpe tipo de *Azospirillum lipoferum*.



**Figura 4.** Raízes de trigo sob a influência da inoculação de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas- *Azospirillum brasiliense* (IAC-AT-8), *Achromobacter insolitus* (IAC-HT-11) e *Zoogloea ramigera* (IAC-HT-12)- e testemunha sem inoculação.

A avaliação do efeito de bactérias diazotróficas endofíticas no metabolismo da planta também pode ser uma importante ferramenta para auxiliar na seleção de bactérias eficientes no aproveitamento do N disponível. Boddey et al. (1986), utilizando mutantes da redutase do nitrato negativos (RN<sup>-</sup>), observaram que os benefícios em plantas de trigo causados por uma estirpe de *Azospirillum* não eram devido à FBN, mas pela maior absorção de N mineral do solo, devido ao aumento na atividade dessa enzima. EL-Komy et al. (2003), também utilizando mutantes RN<sup>-</sup> de *Azospirillum*, observaram que estirpes RN<sup>+</sup> eram mais eficientes em proporcionar aumento do N acumulado em plantas de trigo. Sala (2007) observou aumento na atividade dessa enzima em plantas de trigo na presença de isolados de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Achromobacter* e *Zoogloea*.

A inoculação de BPCP pode aumentar o transporte de íons pelas raízes e, conseqüentemente, a absorção de N em plantas de trigo associadas a bactérias do gênero *Azospirillum* (Amooaghaie et al., 2002) e em plantas de canola associadas a *Achromobacter* (Bertrand et al., 2000). Esses últimos autores também sugerem que o aumento na absorção de íons pode ser devido a modificações na demanda nutricional da planta quando associada à bactéria.

Outros mecanismos podem ser responsáveis pelos benefícios propiciados pela inoculação. Em plantas de tomate foi demonstrado que um isolado de *Achromobacter piechaudii* causou resistência à salinidade (Mayak et al., 2004a) e ao estresse hídrico (Mayak et al., 2004b), sendo que este último efeito também já foi observado em plantas de trigo associadas a uma estirpe do gênero *Azospirillum* (Creus et al., 2004).

## 7. Aplicação Prática

De acordo com Bashand & Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna, desde que consistentes. Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, ou seja, falta de reprodutibilidade dos resultados, que são principalmente atribuídas às técnicas de inoculação (Bashan, 1986), ao genótipo da planta hospedeira (Iniguez et al, 2004), às características do solo, como quantidade de matéria orgânica (Dobbelaere et al., 2002), ou à comunidade nativa de microrganismos (Baldani et al., 1986), o que tem desfavorecido a produção de um inoculante comercial (Dobbelaere et al., 2002).

Entretanto, a inoculação pode ser considerada uma prática pouco onerosa. Sala (2007) e Sala et al. (2007) demonstraram que um isolado de *Achromobacter insolitus* promoveu o aumento da produção de grãos em plantas de trigo em quatro experimentos realizados em condições de campo, sendo que esses aumentos foram obtidos, inclusive, com a adição de adubo nitrogenado. A inoculação foi economicamente viável nas doses intermediária e alta de adubação nitrogenada, revertendo em lucro para o agricultor (Tabela 1).

Apesar das respostas à inoculação em cereais ou gramíneas não poderem ser comparadas à cultura da soja, em artigo de revisão sobre 20 anos de inoculação de

*Azospirillum* em experimentos de campo, os autores recomendam a implantação de um inoculante comercial, concluindo que é possível promover o aumento da produtividade em importantes culturas agrícolas, em diferentes solos e em diferentes regiões climáticas. O sucesso da inoculação foi obtido em 60-70% dos experimentos já realizados (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

**Tabela 1.** Cálculos econômicos da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*, baseado nos preços médios de inoculante e da uréia, praticados no mercado de Campinas (SP).

Experimento Local	Ano	Dose de N	Lucro (R\$ ha <sup>-1</sup> )	acima da testemunha %
Campinas	2002	120 kg ha <sup>-1</sup>	125,00	12
Mococa	2002	120 kg ha <sup>-1</sup>	183,00	35
Campinas	2003	120 kg ha <sup>-1</sup>	198,00	27
Campinas	2005	60 kg ha <sup>-1</sup>	270,00	28

Desde o trabalho pioneiro de Cavalcante & Döbereiner (1988) com a bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar, muito já foi pesquisado. Entretanto, atualmente, devido ao crescente desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e aos programas de Bioenergia, especial ênfase deve ser dada à pesquisa da associação dessa cultura com bactérias diazotróficas. Geralmente, as plantas são micropropagadas com o objetivo de manter as características genéticas e eliminar possíveis patógenos, ocorrendo, entretanto, a eliminação das bactérias diazotróficas endofíticas. Os principais gêneros associados à cana-de-açúcar são *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum*, que têm pouca sobrevivência no solo e são disseminados principalmente pela propagação vegetativa. Assim, o emprego de bactérias diazotróficas no manejo de obtenção de mudas micropropagadas pode ser uma importante ferramenta para introdução comercial da prática da inoculação dessas BPCPs.

Muitos avanços foram realizados na pesquisa sobre bactérias diazotróficas associadas a culturas de grande importância econômica. Todavia, ainda há muito a ser feito, desde estudos sobre os microrganismos e os processos envolvidos na associação com as plantas hospedeiras até a aplicação dessa biotecnologia pelos agricultores.

## Referências

AMOOAGHAIE, R.; MOSTAJERAN, A.; EMTIAZI, G. The effect of compatible and incompatible *Azospirillum brasilense* strains on proton efflux of intact wheat roots. **Plant and Soil**, v.243, p.155–160, 2002.

ANTONYUK, L.P., EVSEEVA, N.V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, v.75, p.470-475, 2006.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v.90, p. 35-46, 1986.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997.

BANDARA, W.M.M.S.; SEVIRATNE, G. KULASOORIYA, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v. 31, p. 645-650, 2006.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: **Encyclopedia of soil in the environment**, HILLEL, D., Elsevier, Oxford, U.K., v. 1, p 103-115, 2005, 200p.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.

BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINÉ, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.229-236, 2000.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of N fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.72-77, 1998.

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v.95, p.109-121, 1986.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA-de los SANTOS, P. *Bulkholderia unamae* sp., a N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1165-1172, 2004.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p.23-31, 1988.

- CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v.37, p.67-72, 2003.
- CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; BARASSI, C.A. Water relations yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Review Canadian Journal of Botanic**, v.2, p.273-281, 2004.
- DALLA SANTA, O R., HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.843-850, 2004.
- DIDONET, D.A.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa de matéria seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.645-651, 1996.
- DIDONET, D.A.; LIMA, O.S.; CANDATEN, M.H. RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.401-411, 2000.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 771-774, 1997.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI.; Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen- fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, Washington, 1976. **Proceedings...** Washington: Washington State University, 1976. p. 518-538.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* an *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHOF, G.; HABRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereiner* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.
- EL-KOMY, H.M.; HAMDIA, M.A.; Abd EL-BAKI, G.K. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. **Biologia Plantarum**, v.46, p.281-287, 2003.
- GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D; FREITAS, J.R.; SEIB, A.M. Diversity of root-associated bacteria with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.43-50, 1998.

GOMES, A.A.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1105-1113, 2005.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; GOPALAKRISHNAN, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Bulkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, v.280, p.239-252, 2006.

GRAHAM, P.H.; VANCE C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.1078-1085, 2004.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, p.197-209, 2000.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUI, W.L.; REDDY, P.M.; LANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.894-906, 2002.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.77-119, 1997.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotrophic colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 785-797, 1997.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS JR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 747-760, 2001.

KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO<sub>3</sub> uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Mirian) in hydroponic systems. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.627-631, 1983.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, G.; GRIMONT, P.A.; KEISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacteria associated with rice and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, v.140, p.679-693, 1989.

KLOEPPER, J.W.; SCHOONERS, B.; BAKER, P.A.H.M. Proposed elimination of the term endorhizosphere. **Phytopathology**, v.82, p.726-727, 1992.

- LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J.; SIX, J. ; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retropects and prospects. **Advances in Agronomy**, v.87, p.85-156, 2005.
- LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbioly**, v.42, p.1112-1120, 1996.
- LI, C.Y.; STRZELCZYK, E. Belowground microbial process underpin forest productivity. **Phyton**, v.40, p.129-134, 2000.
- MACEDO, I.C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v.21, p.157-165, 2007.
- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.55, p.417-430, 1983.
- MAHBOOB, A.; ASGHAR, M. Response of *Triticum aestivum* to associative diazotroph inoculum under varying levels of nitrogen fertilizer. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.1, p.642-643, 2002.
- MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.27-34, 2004
- MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; OMAH, H.; SCHMIDT, W. N<sub>2</sub> fixing bacteria in the rhizosphere: quantification and hormonal effects on root development. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.152, p.237-245, 1989.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.565-572, 2004 a.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, v.166, p.525-530, 2004 b.
- MCINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-342, 1995.
- MERTENS, T.; HESS, D. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. **Plant and Soil**, v.82, p.87-99, 1984.
- MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the super (<sup>15</sup>N) isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p 657-663, 1990.
- NJOLOMA, J. ; TANAKA, K.; SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. **Biology and Fertility of Soil**, v.43, p.137-143, 2006.
- OGÜT, M.; AKDAG, C.; DUZDEMIR, O.; SAKIN, A. M. Single and dougle inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v.41, p.262-272, 2005.



OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; JAMES, E.K.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease and resistant sugar cane varieties by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v.135, p.723-737, 1997.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potencial inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.223-228, 1985.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; URQUAIA, S.; DOBEREINER, J. Interação sorgo-micorriza vesicular-arbuscular-bactérias diazotróficas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 19., Santa Maria, 1990. **Resumos**. Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1990. p.24.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *A. diazotrophicus* in infection of sweet potato, sugar cane, sweet shorgum. **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.111-115, 1991.

PAULA, M.A.; URQUAIA, S.; SIQUEIRA, J.O.; DOBEREINER, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and grown of sweet potato. **Biology and Fertility of Soils**, v.14, p.61-66, 1992.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; DOBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo arbusculares e de bactérias diazotróficas na cultura da batata-doce. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, p.349-356, 1993.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS J. and HIRANO S. (Eds). **Microbial ecology of leaves**. New york: Springer Verlag, 1991, p. 179-197.

REINHOULD, B.; HURCK, T.; FENDRICK, I.; GILLIS, M.; DELEY, J. *Azospirillum halopraeferans* nov. a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grasses. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.37, p.43-51, 1987.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, p.227-247, 2000.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A, SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35, p.1201-1204, 2005.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.56, p.1341-1348, 2006.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352, 2005.

SALA, V.M.R. Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*, em condições de campo. Tese (Doutorado), Esalq-USP, Piracicaba, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10042007-161807/>

SALA, V.M.R.; BRAN, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, p.215-222, 2002.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif<sup>-</sup> mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.358-366., 2001.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, K.K.; BRUIJN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v.194, p.25-36, 1997.

TILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N.; PAL, K.K.; DE, R.; SAXENA, A.K.; NAUTIYAL, C. S.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A.K.; JOHRI, B.N. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**, v.89, p.136-150, 2005.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Yu.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117-126, 2006.

URGUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v.194, p.99-114, 1997.

# Capítulo 7

## Biologia Molecular do Desenvolvimento de Micorrizas Arbusculares

Marcio Rodrigues LAMBAIS <sup>(1)</sup>

Apesar de as micorrizas serem conhecidas há mais de um século, os mecanismos que regulam seu desenvolvimento e funcionamento ainda não foram elucidados. Além do crescimento intercelular, típico de ecto e endomicorrizas, o processo de colonização das raízes pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é caracterizado pelo crescimento intracelular das hifas no tecido cortical e pela diferenciação de hifas intracelulares terminais em estruturas efêmeras e semelhantes a haustórios chamadas arbúsculos (Bonfante-Fasolo, 1984). Embora o crescimento fúngico intrarradicular seja extenso em micorrizas arbusculares (Mas), as reações de defesa da planta são brandas e localizadas, sugerindo a existência de um mecanismo de reconhecimento mútuo dos simbiontes (Siqueira et al., 2002).

A sinalização molecular entre os simbiontes deve ter início muito antes de seu contato físico. Para a germinação dos esporos, é pouco provável que haja troca de sinais. Normalmente, esporos germinarão quando as condições de umidade, temperatura e pressão parcial de CO<sub>2</sub> forem favoráveis. Quando nas proximidades das raízes de plantas hospedeiras, o crescimento e a ramificação de hifas dos FMAs são altamente estimulados, sugerindo a existência de mecanismos de sinalização específicos (Bécard & Fortin, 1988; Giovannetti et al., 1993). Tem sido observado que fatores presentes nos exsudatos de plantas hospedeiras estimulam o crescimento e a ramificação de hifas e a divisão nuclear de FMAs (Buee et al., 2000; Douds & Nagahashi, 2000).

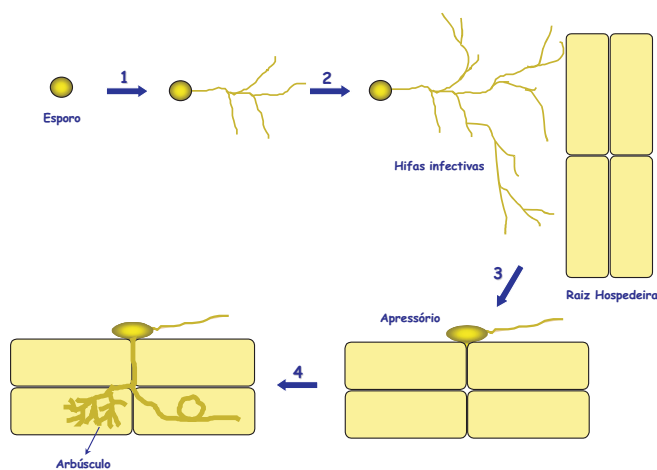
A natureza dessas moléculas sinais ainda não foi determinada. Certos compostos fenólicos sintetizados pelas plantas podem estimular a germinação de esporos e o crescimento de hifas *in vitro*, mas não são essenciais para o desenvolvimento da simbiose, como em interações leguminosas-rizóbios (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Bécard et al., 1992; Bécard et al., 1995).

---

<sup>(1)</sup> Professor, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Ciência do Solo, Av. Pádua Dias, 11, CEP - 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: mlambais@esalq.usp.br.

Buee et al. (2000) demonstraram, usando mutantes de milho deficientes em síntese de chalcona, que os fatores estimulantes presentes nos exsudatos de plantas hospedeiras não incluem flavonóides.

Em várias interações fungo-planta, a primeira e mais importante indicação de reconhecimento de um hospedeiro compatível é a diferenciação de hifas fúngicas em apressórios (Staples & Macko, 1980). A formação de um apressório funcional, após a proliferação e a ramificação abundante das hifas de FMAs na rizosfera de plantas hospedeiras (Giovannetti et al., 1994) e adesão à superfície da célula vegetal, resulta em penetração e posterior colonização do tecido cortical (Figura 1). Ao contrário do que é observado em plantas hospedeiras, espécies de *Glomus* não são capazes de formar apressórios funcionais em raízes de plantas não hospedeiras dos gêneros *Brassica* e *Lupinus*, muito embora dilatações de hifas, semelhantes a apressórios, possam ser observadas na superfície das raízes (Glenn et al., 1985; Giovannetti et al., 1993). Esses dados sugerem que fatores essenciais para a completa diferenciação de apressórios funcionais só ocorrem em plantas hospedeiras. Esse fator de reconhecimento parece ser afetado também pela concentração de P na planta. A ocorrência de dilatações em hifas de FMAs é maior na superfície de raízes em condições de alto nível de P (Lambais & Mehdy, 1998), sugerindo que a síntese do fator responsável pela indução da formação de apressórios funcionais é inibida, ou esse fator é inativado, nessas condições. Giovannetti et al. (1993) demonstraram o fator que estimula a dilatação de hifas e sua diferenciação em apressórios funcionais não tigmotrópicos e sugeriram a necessidade de sua interação com a membrana plasmática para que esse processo ocorra. No entanto, foi demonstrado que a diferenciação em apressórios depende do reconhecimento específico da parede celular de células epidérmicas, em um processo dependente de contato (Nagahashi & Douds, 1997).

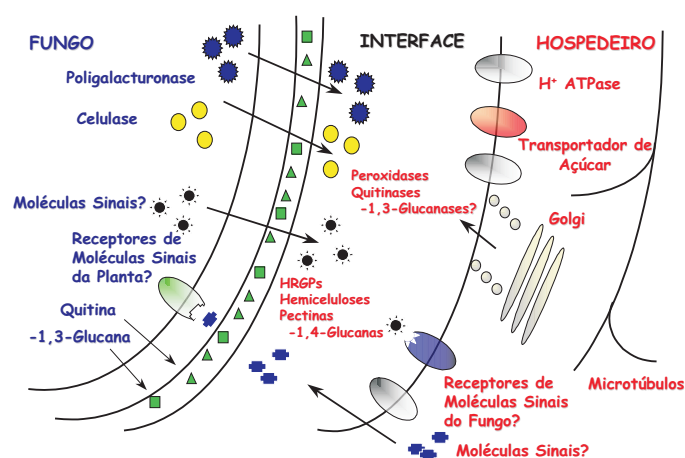


**Figura 1.** Representação gráfica dos principais eventos que ocorrem durante o processo de colonização das raízes de uma planta hospedeira por um fungo micorrízico arbuscular. 1. germinação do esporo; 2. ramificação das hifas nas proximidades da raiz, 3. diferenciação do apressório; 4. colonização intrarradicular (modificado de Lambais, 1996).

O processo de infecção, propriamente dito, tem início na superfície da raiz, pela penetração. Aparentemente, a penetração ocorre por combinação de pressão mecânica e degradação enzimática parcial da parede celular vegetal. A produção de enzimas hidrolíticas como pectinases, celulases e hemicelulases já foi detectada em esporos de *Glomus mosseae* (Garcia-Romera et al., 1991a, b; Garcia-Garrido et al., 1992). Peretto et al. (1995), usando cromatografia líquida, detectaram a presença de dois picos com atividades de poligalacturonase, presentes somente em raízes micorrizadas, embora as atividades totais fossem semelhantes em raízes micorrizadas e não micorrizadas. Essas enzimas foram localizadas, por imunocitoquímica, no citoplasma do fungo e na interface ao redor de hifas intracelulares, sugerindo origem fúngica e uma possível participação na degradação da parede celular vegetal. No entanto, em comparação com espécies de fungos patogênicos necrotróficos, as quantidades de enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal produzidas por FMAs são muito baixas. Os baixos níveis de atividade e a produção localizada dessas enzimas resguardariam a integridade do tecido do hospedeiro e evitariam a ativação do sistema de defesa vegetal, possibilitando o desenvolvimento de uma interação plenamente compatível.

A colonização intrarradicular é limitada aos tecidos externos à endoderme e dá-se pelo crescimento inter e intracelular das hifas. O crescimento intracelular inicial é caracterizado pela formação de simples enovelamentos (hifas transcelulares) e pela invaginação da membrana plasmática vegetal, de modo que não existe comprometimento da integridade das células hospedeiras. Esse processo é acompanhado também pela deposição de material semelhante à parede celular vegetal ao redor da hifa, criando uma região apoplástica (interface) com características bioquímicas específicas (Figura 2) (Bonfante & Perotto, 1995). Dependendo do genótipo vegetal, hifas intracelulares diferenciam-se em arbúsculos na parte mais interna do córtex. Essas estruturas são formadas pela contínua ramificação dicotômica das extremidades das hifas, são efêmeras, de ciclo curto (4-5 dias) e responsáveis pela troca bidirecional de nutrientes entre os simbioses. Tanto as células vegetais quanto as hifas fúngicas passam por profundas alterações morfológicas e fisiológicas durante o desenvolvimento dos arbúsculos, definindo a funcionalidade da simbiose.

Nas hifas intercelulares e intracelulares não diferenciadas, a parede celular é tipicamente fibrilar e contém quitina na forma cristalina. Durante a diferenciação dos arbúsculos, a parede celular fúngica torna-se amorfa e cadeias de quitina não podem ser detectadas utilizando-se quitinase marcada com ouro, embora seja possível detectar oligômeros de N-acetilglicosamina utilizando-se uma lectina específica para esse açúcar (Bonfante-Fasolo, 1988). Esses dados sugerem que a polimerização da quitina não é completa ou que esse polímero não ocorre na forma cristalina na parede celular dos arbúsculos. Polímeros de  $\beta$ -1,3-glucanas, associados à quitina na parede celular de hifas inter e intracelulares não diferenciadas de fungos das famílias *Glomaceae* e *Acaulosporaceae*, também não são observados na parede celular de arbúsculos (Lemoine et al., 1995). Adicionalmente, intensa síntese de membrana plasmática, fragmentação do vacúolo, aumento do volume de citoplasma, decréscimo no número de amiloplastos, movimentação do núcleo, rearranjo do citoesqueleto e aumento da atividade de transcrição são também alterações observáveis durante o desenvolvimento dos arbúsculos (Bonfante & Perotto, 1995).



**Figura 2.** Modificações bioquímicas que ocorrem no fungo, na planta e nos espaços intercelulares entre os simbiontes em micorrizas arbusculares (modificado de Lambais, 1996).

Alterações bioquímicas no fungo e no hospedeiro ocorrem não somente durante o desenvolvimento de arbúsculos, como também durante o processo de colonização intrarradicular, de uma maneira geral. Evidências de alterações do metabolismo do fungo são dadas pelas observações da atividade e localização de ATPases e da atividade de fosfatase alcalina vacuolar. Durante o crescimento de hifas a partir de esporos germinados, ATPases ativas são localizadas em uma região próxima à extremidade das hifas, enquanto que em hifas intercelulares e arbúsculos elas se localizam ao longo de toda membrana plasmática fúngica. Já a atividade de fosfatase alcalina vacuolar é maior durante o processo de colonização das raízes, em comparação com a atividade em hifas provenientes de esporos germinados (Gianinazzi-Pearson et al., 1995). No hospedeiro, a expressão diferencial de vários genes envolvidos na defesa vegetal contra o ataque de patógenos, avaliada com base em atividades enzimáticas, acúmulo de proteínas e/ou de mRNAs, tem sido observada durante o desenvolvimento de MAs e podem ter papel fundamental no controle da colonização intrarradicular (Lambais, 2000; Lambais & Mehdy, 1995).

O crescimento de FMAs no interior das raízes parece ser um processo "controlado", já que a colonização de tecidos meristemáticos e/ou de vasos condutores não ocorre. Adicionalmente, nem todas as células corticais são infectadas e a diferenciação de hifas terminais em arbúsculos ocorre somente em algumas das células infectadas. No entanto, os fatores atuantes nesse controle são desconhecidos. A regulação do desenvolvimento de MAs e sua funcionalidade deve envolver uma complexa troca de sinais ("cross-talk") entre os simbiontes, que pode ser afetada também pelas condições edafoclimáticas. O resultado dessa sinalização é a síntese dos simbiossomas, representados pelos arbúsculos, membrana periarbuscular e interfaces características.

Apesar da colonização extensa das raízes pelos FMAs, não há desenvolvimento de sintomas evidentes de resposta de hipersensibilidade típica (acúmulo de fitoalexinas e morte das células microbianas e do hospedeiro) em MAs (Gianinazzi, 1991), em

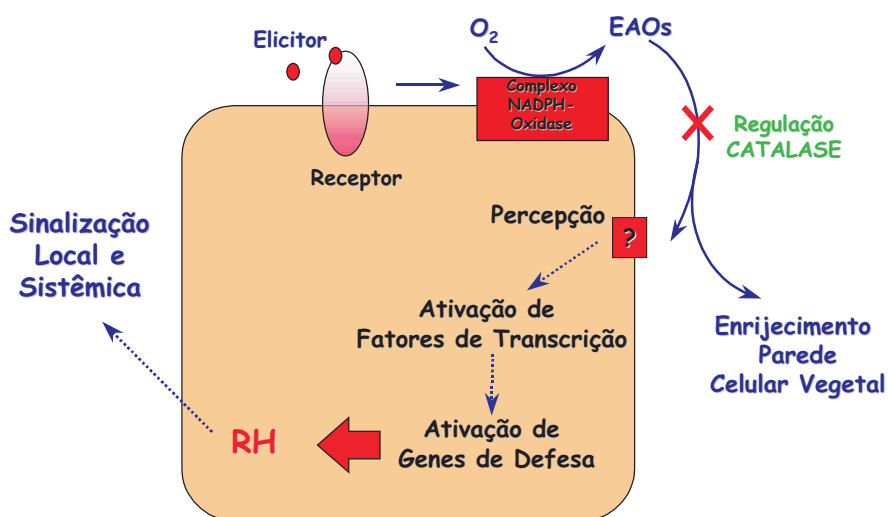
oposição ao que ocorre em interações planta-patógenos incompatíveis. O acúmulo de fitoalexinas ocorre predominantemente nas fases mais tardias do desenvolvimento da simbiose e atinge concentrações muito inferiores àquelas observadas em interações com o fungo patogênico *Rhizoctonia solani*, por exemplo (Morandi et al., 1984; Wyss et al., 1991). A ausência de resposta de hipersensibilidade é, da mesma forma, observada na simbiose entre leguminosas e rizóbios. Aparentemente, em ambos os sistemas, os microssimbiontes são reconhecidos pelos hospedeiros de modo a formarem interações compatíveis. No entanto, em raízes de alfafa transformadas com o T-DNA indutor de raízes de *Agrobacterium*, a inoculação com *Gigaspora margarita*, um fungo com baixa eficiência de colonização em condições de casa-de-vegetação, induz respostas semelhantes à resposta de hipersensibilidade. As células infectadas tornam-se necróticas e acumulam compostos fenólicos, indicando a existência de especificidade entre o fungo e o hospedeiro (Douds et al., 1998).

A utilização de modelos de sinalização e regulação gênica que ocorrem nas simbioses leguminosas-rizóbios para a compreensão dos processos atuantes em MAs é extremamente válida, mas merece considerações, principalmente devido à especificidade típica da primeira simbiose, a qual não é observada em MAs. A existência de fatores comuns entre os dois tipos de simbiose tem sido sugerida, pelo fato de que mutantes de plantas de ervilha que não são capazes de desenvolver MA típica e têm a infecção bloqueada em um estágio imediatamente posterior à formação do apressório, isto é *myc*<sup>-</sup> precoces, são também não nodulantes, isto é *nod*<sup>-</sup> (Duc et al., 1989; Gianinazzi-Pearson et al., 1995). Mutantes que formam nódulos não fixadores, isto é *nod*<sup>+</sup> *fix*<sup>-</sup>, também não desenvolvem MA típica. Nesse caso, ocorre penetração e colonização intercelular, mas não há formação de arbúsculos, definindo os mutantes *myc*<sup>-</sup> tardios (Lambais, 1996). Diferente dos mutantes *myc*<sup>-</sup> precoces de ervilha, mutantes de *Lotus japonicus* não nodulantes têm o desenvolvimento da MA bloqueado na colonização do córtex e foram denominados *Coi*<sup>-</sup> ("cortex invasion") (Wegel et al., 1998). Adicionalmente, raízes micorrizadas sintetizam proteínas imunologicamente relacionadas com nodulinas, proteínas específicas de nódulos (Wyss et al., 1990; Perotto et al., 1994) e fatores *Nod* são capazes de estimular a colonização intrarradicular (Xie et al., 1995).

Tem sido sugerido que o processo de colonização intrarradicular por FMAs depende da capacidade do fungo em evitar a ativação ou mesmo suprimir o sistema de defesa vegetal (Lambais & Mehdy, 1996; Blee & Anderson, 2000; Lambais, 2000; Shaul et al., 2000). Em MAs, as atividades de quitinases são induzidas nos estádios iniciais do desenvolvimento da simbiose e suprimidas posteriormente a níveis inferiores aos observados em controles não micorrizados (Spanu et al., 1989; Lambais & Mehdy, 1993). Essa supressão é atenuada em condições de alta disponibilidade de P e pode ser essencial para o desenvolvimento dos fungos micorrízicos nas raízes (Lambais & Mehdy, 1993). Nessas condições, o acúmulo de mRNAs codificando uma isoforma ácida de quitinase é induzido em células contendo arbúsculos ou em sua vizinhança (Lambais & Mehdy, 1998). As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanases em MAs são também suprimidas em certos estádios do desenvolvimento da simbiose e dependem da concentração de P e da interação fungo-planta (Lambais & Mehdy, 1995).

Em condições de baixa disponibilidade de P, tem sido observado acúmulo de mRNAs codificando uma isoforma de  $\beta$ -1,3-glucanase, homóloga a uma isoforma básica de soja, em células contendo arbúsculos e suas imediações. Além da indução localizada, uma supressão sistêmica, em condições de alta concentração de P disponível ou em raízes micorrizadas, também tem sido observada (Lambais & Mehdy, 1998).

Os mecanismos que controlam o sistema de defesa vegetal durante o desenvolvimento de MAs não são conhecidos. É possível que a regulação diferencial de isoformas de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em MAs seja uma conseqüência de alterações hormonais e/ou síntese de moléculas indutoras/supressoras específicas (Lambais & Mehdy, 1995; David et al., 1998). Alternativamente, a regulação diferencial de catalases observada em raízes micorrizadas poderia contribuir para controlar a concentração de  $H_2O_2$  (um mensageiro secundário no processo de transmissão de sinais em interações planta-patógenos) nos sítios de infecção e contribuir para evitar a ativação do sistema de defesa (Figura 3) (Lambais, 2000). O desenvolvimento de novas técnicas de análise de expressão gênica, como hibridização em "microarrays" (arranjos ordenados de milhares de genes em lâminas de vidro especiais), análise sistemática de ESTs ("Expressed Sequence Tags") e SAGE ("Serial Analyses of Gene Expression"), bem como a análise de proteomas de raízes micorrizadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa certamente contribuirão para o completo entendimento dos mecanismos que controlam a formação de MAs.



**Figura 3.** Modelo para o mecanismo de sinalização molecular e controle da expressão de genes de defesa por catalases em micorrizas. O reconhecimento de indutores fúngicos resultaria na produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), principalmente  $H_2O_2$ , as quais ativariam a expressão de genes de defesa e induziriam uma resposta de hipersensibilidade (RH). A indução de atividades de catalases em micorrizas arbusculares resultaria na degradação do  $H_2O_2$ , evitando ou minimizando a ativação do sistema de defesa vegetal e a RH (modificado de Lambais, 2000).



## Referências

- BÉCARD, G. & FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytol.**, v.108, p. 211-218, 1988.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D.D. & PFEFFER, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p. 821-825, 1992.
- BÉCARD, G.; TAYLOR, L.P.; DOUDS Jr., D.D.; PFEFFER, P.E. & DONER, L.W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 8, p. 252-258, 1995.
- BLEE, K.A & ANDERSON, A.J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press. p. 27-45. 2000.
- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: **VA Mycorrhiza**. Powell, C.Ll. and Bagyaraj, D.J., eds. CRC Press, Boca Raton. pp. 5-33. 1984.
- BONFANTE-FASOLO, P. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. In: **Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis**. Scannerini, S. et al., eds. NATO ASI Series, vol. H17. Springer-Verlag, New York. pp. 219-235. 1988.
- BONFANTE, P. & PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytol.**, v. 130, p. 3-21, 1995.
- BUEE, M.; ROSSIGNOL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R. & BECARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 13. p. 693-698, 2000.
- DAVID, R., ITZHAKI, H., GINZBERG, I., GAFNI, Y., GALILI, G., AND KAPULNIK, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 11, p. 489-497, 1998.
- DOUDS, D. D.; GALVEZ, L.; BÉCARD, G. & KAPULNIK, Y.. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. **New Phytol.**, v. 138, p. 27-35, 1998.
- DOUDS, D.D. & NAGAHASHI, G. Signaling an recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press. p. 11-18. 2000.
- DUC, G.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). **Plant Sci.**, v. 60, p.215-222, 1989.
- GARCIA-GARRIDO, J.M.; GARCIA-ROMERA, I. & OCAMPO, J.A. Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. **New Phytol.**, v. 121, p.221-226, 1992.

GARCIA-ROMERA, I.; GARCIA-GARRIDO, J.M. & OCAMPO, J.A. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 78, p.343-346, 1991a.

GARCIA-ROMERA, I.; GARCIA-GARRIDO, J.M. & OCAMPO, J.A. Pectinase activity in vesicular-arbuscular mycorrhiza during colonization of lettuce. **Symbiosis**, v. 12, p. 189-198, 1991b.

GIANINAZZI, S. Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. **Agric. Ecosystems Environ.**, v. 35, p.105-119, 1991.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GOLLOTTE, A.; LHERMINIER, J.; TISSERANT, B.; FRANKEN, P.; DUMAS-GAUDOT, E.; LEMOINE, M.C.; van TUINEN, D. & GIANINAZZI, S. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. **Can. J. Bot.**, v. 73, (Suppl. 1), p. S526-S532, 1995.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. & CITERNESI, S. Factors affecting appressorium development in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. **New Phytol.**, v. 123, p. 115-122, 1993.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; CITERNESI, S.; AVIO, L.; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Recognition and infection process, basis for host specificity of arbuscular mycorrhizal fungi. In: **Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems**. Gianinazzi, S. & Schüepp, H. (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 61-87. 1994.

GLENN, M.G.; CHEW, F.S. & WILLIAMS, P.H. Hyphal penetration of *Brassica* (Cruciferae) roots by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytol.**, v. 99, p.463-472, 1985.

LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J.O. **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. UFLA, Lavras, MG. p. 5-38. 1996.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, p. 46-60. 2000.

LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, b-1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 6, p. 75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Can. J. Bot.**, v.73, (Suppl. 1), p. S533-S540, 1995.

LAMBAIS, M. R., AND MEHDY, M. C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and b-1,3-glucanase expression. **New Phytol.**, v.134, p.531-538, 1996.

LAMBAIS, M. R., AND MEHDY, M. C. Spatial distribution of chitinases and b-1,3-glucanase transcripts in bean mycorrhizal roots under low and high phosphate conditions. **New Phytol.**, v. 140, p.33-42, 1998.

LEMOINE, M.C.; GOLLOTE, A. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Localization of b(1-3) glucan in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe and *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe during colonization of host roots. **New Phytol.**, v. 129, p. 97-105, 1995.

MORANDI, D.; BAILEY, J.A. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 24, p.357-364, 1984.

Nagahashi, G. & Douds, D. D. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. **New Phytol.**, v. 136, p.299-304, 1997.

NAIR, M.G.; SAFIR, G.N. & SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p.434-439, 1991.

PERETTO, R.; BETTINI, V.; FAVARON, F.; ALGHISI, P. & BONFANTE, P. Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. **Mycorrhiza**, v. 5, p.157-163, 1995.

PEROTTO, S.; BREWIN, N.J. & BONFANTE, P. Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 7, p.91-98, 1994.

SHAUL, O.; DAVID, R.; SINVANI, G.; GINZBERG, I.; GANON, D.; WININGER, S.; BENDOR, B.; BADANI, H.; OVDAT, N. & KAPULNIK, Y. Plant defense responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press. p. 61-68. 2000.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytol.**, v. 118, p. 87-93, 1991.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R. & STÜRMER, S. Fungos micorrízicos arbusculares: características, simbiose e aplicação na agricultura. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 2002.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A. & BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, v. 177, p.447-455, 1989.

STAPLES, R.C. & MACKO, V. Formation of infection structures as a recognition response in fungi. **Exp. Mycol.**, v. 4, p.2-16, 1980.

WEGEL, E.; SCHAUSER, L.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. & PARNISKE, M. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 11, p. 933-936, 1998.

WYSS, P.; BOLLER, T. & WIEMKEN, A. Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by a mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) in soybean roots. **Experientia**, v. 47, p.395-399, 1991.

WYSS, P.; MELLOR, R.B. & WIEMKEN, A. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. **Planta**, v. 182, p.22-26, 1990.

XIE, Z.-P.; STAEHELIN, C.; VIERHEILIG, H.; WIEMKEN, A.; JABBOURI, S.; BROUGHTON, W.J.; VÖGELI-LANGE, R. & BOLLER, T. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1519-1525, 1995.

# Capítulo 8

## Emprego de Técnicas Moleculares na Taxonomia e em Estudos Sobre Ecologia e Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Milene Moreira da SILVA <sup>(1)</sup> e Arnaldo COLOZZI FILHO <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

A maioria das plantas forma associações simbióticas com fungos da ordem Glomales, denominados fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Os simbioses relacionam-se pela colonização radicular realizada pelos fungos, que produzem estruturas típicas (arbúsculos) no tecido cortical. Na interface formada pelos arbúsculos e as células corticais, ocorrem trocas de nutrientes minerais e metabólitos entre fungo e planta, estabelecendo-se um fluxo bidirecional. Os nutrientes são absorvidos do solo pelo micélio extrarradicular e translocados para a planta, ao mesmo tempo em que a planta disponibiliza para o fungo carboidratos sintetizados por ela. O caráter mutualista dessa simbiose garante vantagens aos simbioses, com efeitos positivos sobre a nutrição das plantas e a produtividade dos cultivos, além de promover a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Embora as micorrizas arbusculares (MAs) sejam conhecidas há muito tempo, tanto no que diz respeito aos FMAs quanto ao seu funcionamento, ainda há muitas questões a serem respondidas para que todo seu potencial possa ser explorado. Conhecimentos mais aprofundados sobre as relações fungo-hospedeiro são fundamentais para o entendimento da infectividade e eficiência simbiótica, visando também à seleção de espécies para programas de inoculação. Isso é importante porque a infectividade dos fungos micorrízicos é variável, pois depende de fatores abióticos, de sua posição taxonômica e, em menor escala, do isolado individual. Os conhecimentos sobre a diversidade e a dinâmica populacional dos FMAs na região rizosférica e dentro das raízes, em diferentes plantas e agroecossistemas, são fundamentais para estabelecer estratégias de manejo da comunidade nativa, visando maximizar os efeitos positivos da micorrização.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora - APTA Regional do Médio Paranapanema, Rodovia SP 333 (Assis - Marília), Km 397, Caixa Postal - 263, CEP - 19802-970, Assis, SP. E-mail: milenemoreira@aptaregional.sp.gov.br;

<sup>(2)</sup> Pesquisador - Instituto Agrônomo do Paraná, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375, Três Marcos, Caixa Postal - 481, CEP - 86001-970, Londrina, PR. E-mail: acolozzi@iapar.br.

A condição de biotrófico obrigatório dos FMAs tem sido o maior entrave para que o conhecimento sobre esses fungos avance. Sua classificação taxonômica baseia-se principalmente em características morfológicas dos esporos, que são variáveis e influenciadas por condições ambientais. Embora os FMAs apresentem algumas características que permitem diferenciá-los ao nível de gênero, sua identificação num nível taxonômico mais detalhado torna-se muitas vezes difícil, em detrimento da verificação de suas variações populacionais. Os estudos sobre diversidade e dinâmica populacional são realizados a partir de esporos coletados na rizosfera que necessitam de identificação para serem interpretados. O estudo da fase endofítica da simbiose também é extremamente importante, pois permite definir, entre os fungos componentes da comunidade rizosférica, aqueles realmente eficientes em colonizar as raízes. Entretanto, atualmente esses estudos dificilmente são realizados porque os métodos não possibilitam sua identificação nas raízes.

Recentemente, com o desenvolvimento e a adaptação de técnicas utilizadas em estudos de biologia molecular para a pesquisa com FMAs, tem sido possível identificar esses fungos dentro e fora das raízes, distinguir diferentes isolados de uma mesma espécie, estudar relações entre espécies e populações, num nível confiável que usualmente os estudos morfológicos clássicos não permitem (Perotto et al., 2000). Essas técnicas incluem o uso de anticorpos específicos, perfil de lipídeos e isoenzimas e técnicas baseadas em PCR com *primers* universais ou específicos (Rosendahl & Sen, 1992; Simon et al., 1992; Bentivenga & Morton, 1994; Clapp et al., 1995; Lanfranco et al., 2001).

Apesar de promissores, esses métodos necessitam de adaptações e estudos para serem rotineiramente utilizados em trabalhos com FMAs. O desenvolvimento de um método rápido e preciso para identificá-los na rizosfera e nas raízes das plantas poderia contribuir para a seleção e o uso de técnicas de manejo do solo, plantas e fungos, visando aumentar o efeito benéfico das micorrizas nos agroecossistemas.

O objetivo deste capítulo é discutir a contribuição e os avanços do emprego de técnicas moleculares na taxonomia e nos estudos de diversidade de FMAs.

## 2. Importância da Taxonomia nos Estudos Envolvendo Micorriza

Embora os FMAs sejam comuns, observados na maioria dos solos e em espécies vegetais distribuídas em todos os ecossistemas terrestres, sua biologia e diversidade começaram a ser estudadas com detalhes somente nas últimas décadas. O interesse surgiu devido ao enorme potencial que seu uso representa para a agricultura de baixo impacto e sustentável.

O termo micorrizas (mico: fungo, riza: raiz) foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank em 1885; entretanto, somente após os anos 50 estruturas reprodutivas dos fungos micorrízicos começaram a ser conhecidas e estudadas. A partir dos primeiros protocolos para crescimento desses fungos em culturas-isca (Mosse, 1953) e protocolos para extração de esporos do solo (Gerdemann, 1955), a pesquisa sobre micorrizas ganhou novo impulso. Com a possibilidade de

multiplicá-los em vasos de cultivo, sua natureza e efeitos nas plantas puderam ser constatados e estudados com mais detalhes, despertando a atenção da comunidade científica internacional. Hoje, existe uma vasta literatura documentando o efeito positivo dos fungos sobre a absorção de nutrientes minerais pelas plantas, especialmente aqueles pouco móveis no solo (P, Cu e Zn) (Marschner, 1986; Cardoso, 1985, 1996; Pacovsky, 1986), maior proteção contra patógenos (Garcia-Garrido & Ocampo, 1989) e nematóides (Lana et al., 1991), tolerância à salinidade dos solos (Sylvia & Williams, 1992), a metais pesados (Andrade et al., 2004) e ao estresse relacionado à água no solo (Barea et al., 1993), entre outros.

À medida que os estudos avançaram ficou cada vez mais evidente a importância da taxonomia para o entendimento dos FMAs. Apesar de apresentarem diferenças morfológicas, essas diferenças não são sempre evidentes a ponto de permitirem sua diferenciação no nível de espécies (Lanfranco et al., 2001). Além disso, embora os FMAs não apresentem especificidade em relação ao hospedeiro, eles são altamente específicos em relação a seus efeitos nas plantas. Essa especificidade pode ser observada não somente no nível de espécies, mas também de isolados (Paula et al., 1988). Também é específica a sensibilidade ou tolerância aos componentes dos ecossistemas, tais como tipo de solo, pH, umidade, fertilidade natural e outros. O completo entendimento do funcionamento da micorriza será resultado da integração de esforços de pesquisas multidisciplinares. Portanto, é fundamental que os pesquisadores conheçam a identidade dos fungos com os quais estão trabalhando, para que possam comparar resultados e possibilitarem sua reprodução por outros grupos. Como relatar, comparar e integrar resultados de pesquisa de trabalhos individuais em diferentes locais, com diferentes hospedeiros, tipos de solo, etc., sem conhecer a identidade da espécie de FMA que está sendo avaliada?

Outro ponto importante são os estudos sobre a biodiversidade. Diversos autores apontam a diversidade de FMAs como um dos fatores-chave que contribuem para a manutenção da diversidade da comunidade de plantas e para a realização de diversos processos biogeoquímicos nos agroecossistemas (Francis & Read, 1995; van der Heijden et al., 1998).

Portanto, a taxonomia é de suma importância para os estudos de diversidade dos fungos micorrízicos, pois pouca informação pode ser compilada ou trocada se as espécies não forem conhecidas.

### **3. Taxonomia de FMA**

A análise filogenética dos FMAs baseia-se principalmente na ontogenia dos esporos e em suas características fenotípicas, tais como: tamanho, forma, cor e aparência, presença de esporocarpos, forma e comprimento da hifa de sustentação, ornamentação, estrutura e espessura da parede (Morton, 1988), e, ainda, propriedades parietais tais como pigmentação, espessura, ornamentação e reações histoquímicas. É difícil interpretar essas características isoladamente. No caso da composição das paredes, por exemplo, geralmente se enrugam, dobram ou sobrepõem-se, separam-se facilmente, ou permanecem aderidas entre si, o que dificulta sua caracterização.

Além das características dos esporos serem bastante variadas, elas podem ser alteradas por pigmentos de solo e raízes, compostos químicos, temperatura, umidade, pH ou mesmo pela atividade de outros microrganismos do solo.

O fato de os FMAs serem simbioses obrigatórios e, portanto, não cultiváveis em meios artificiais, torna mais difícil sua identificação morfológica, surgindo muitas dúvidas sobre a verdadeira posição sistemática de algumas espécies.

A identificação de esporos coletados diretamente do solo no campo pode apresentar também muitas dificuldades. Muitas vezes eles têm aparência sadia, mas não são viáveis, podendo persistir no solo como uma casca por muitos anos. Também, por pressões do ambiente (pH, conteúdo de argila, etc) eles podem ter suas características originais alteradas, o que dificulta a identificação. Outro ponto importante é que esporos extraídos de amostras coletadas diretamente no campo podem representar somente aqueles fungos que estão colonizando as raízes mais ativamente, tendo, portanto biomassa suficiente para produzir uma abundante esporulação. Nesse caso, fungos eficientes que produzem poucos esporos podem não ser identificados.

Devido a essas considerações, a identificação dos FMAs a partir de esporos coletados diretamente no campo não é recomendada. Entretanto, para estudos exploratórios da diversidade, esse procedimento é aceito quando se trabalha com espécies de ocorrência comum, previamente classificada. Segundo Morton (1993), a descrição de muitos táxons foi baseada em coletas únicas em situação de campo, a partir de esporos de idade desconhecida, degradados, parasitados ou modificados por fatores abióticos, o que favorece interpretações equivocadas. Muitas espécies foram descritas a partir de espécimes parasitados (Bhattarcharjee et al., 1982) ou material preservado (Berch & Trappe, 1985).

Para a classificação de FMAs indígenas e sua descrição recomenda-se que os fungos sejam multiplicados em culturas-isca, em casa de vegetação sob condições controladas. Embora seja um método eficiente para obtenção de esporos, devido à baixa especificidade na relação fungo-hospedeiro apresentada pelos FMAs, também apresenta algumas dificuldades. A multiplicação de espécies em planta hospedeira, a partir de amostras de solo coletadas diretamente no campo, pode não ser representativa de todos os indivíduos componentes da comunidade. Algumas espécies podem ser incapazes de colonizar a planta hospedeira ou mesmo, caso colonizem, podem esporular pouco no solo, dificultando o estudo da comunidade. É preciso também considerar que as culturas-isca podem fornecer resultados extremamente variados porque, mesmo mantidas em condições controladas, dependem de fatores bióticos e abióticos que incidem sobre a planta hospedeira e o fungo.

A classificação morfológica clássica dos FMAs é realizada com base em chaves de identificação ao nível de espécies, tais como as de Schenck & Pérez (1988) e Walker & Trappe (1993). Recentemente, as descrições das espécies foram compiladas e estão disponíveis no sítio <http://invam.caf.wvu.edu/>. Nesse sítio é possível obter também informações que vão desde protocolos para a multiplicação de esporos em cultura-isca até sobre os parâmetros utilizados na sua classificação morfológica.

A classificação atual dos FMAs baseia-se na morfologia e ontogenia dos esporos mas já considera alguns aspectos moleculares, como resultado da aplicação das técnicas de biologia molecular (Morton & Redecker, 2001).



A taxonomia dos FMAs sempre foi complexa e a identificação se baseava exclusivamente na avaliação de caracteres morfológicos, principalmente aspectos sub-celulares, relacionados com as paredes do esporo (Walker, 1983), tais como número e tipo de camadas, espessura, pigmentação, ornamentação e reações histoquímicas (Bentivega & Morton, 1994). Nesse contexto, encontram-se chaves de identificação para as espécies, ou descrições evidenciando características com valor taxonômico como: esporos (ontogenia, tamanho, coloração, constituição das paredes), tipo de hifa esporígena, células auxiliares (forma e tamanho) (Morton, 1988; Schenck & Pérez, 1988).

A obtenção de novos conhecimentos resultou em uma nova proposta para classificação, com inclusão em uma nova ordem (Stubblefield & Taylor, 1988; Pirozynski & Dalpé, 1989; Morton, 1990; Morton & Benny, 1990).

Devido à complexidade taxonômica dos FMAs, a aplicação de técnicas quimiotaxonômicas, como por exemplo, comparação do conteúdo de lipídios nos diferentes gêneros, pode auxiliar na identificação desses microrganismos. Nesse contexto, destacam-se vários estudos como de Jabaji-Hare (1988), Sancholle & Dalpé (1993) e Gaspar et al. (1994), entre outros. Deve-se salientar que muitos fatores afetam a quantidade e a qualidade dos ácidos graxos, no entanto, esses resultados são mais uma ferramenta que auxilia na identificação dos táxons (Sancholle & Dalpé, 1993).

Estudo associando caracteres bioquímicos, moleculares e morfológicos propôs duas novas famílias: Archeosporaceae e Paraglomaceae e dois novos gêneros: *Archeospora* e *Paraglomus* (Morton & Redecker, 2001). No entanto, nesse mesmo ano, outro estudo, realizado a partir da análise filogenética da subunidade do DNA ribossômico (unidade conservada do genoma) pela técnica de PCR, propôs o Filo Glomeromycota para abrigar os FMAs (Schübler et al., 2001). Os autores indicaram uma origem monofilética para o grupo, aceitaram a Ordem Glomales de Morton & Benny (1990), corrigindo o táxon (Glomerales), e criaram três novas ordens: Paraglomerales, Diversisporales e Archeosporales.

Recentemente, a classificação dos FMAs passou por novas reformulações. Oehl & Sieverding (2004) criaram o gênero *Pacispora* e Walker et al. (2004) estabeleceram a família Gerdemanniaceae, com o gênero *Gerdemannia* ambos na Ordem Diversisporales. Entretanto, ambos os trabalhos foram baseados no estudo da espécie *Glomus scintillans*. Como o trabalho de Oehl & Sieverding (2004) foi publicado primeiro, Walker et al. (2004), baseando-se nas regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, consideraram *Gerdemannia* como sinônimo homotípico de *Pacispora* e invalidaram a família Gerdemanniaceae. Como os autores não propuseram uma família para abrigar o gênero criado (Oehl & Sieverding, 2004), Walker et al. (2004) estabeleceram a família Pacisporaceae e validaram a Ordem Diversisporales para abranger a família Diversisporaceae e o gênero *Diversispora*; É importante ressaltar que esses táxons foram propostos por Schübler et al. (2001), mas não foram considerados válidos por não terem representantes.

Essas mudanças recentes na taxonomia dos FMAs evidenciam a necessidade de mais estudos que possam contribuir para o conhecimento da história evolutiva do grupo. As técnicas moleculares, bioquímicas e de ultraestrutura aplicadas à classificação dos FMAs são ferramentas que auxiliam na identificação dos táxons.

Atualmente são descritas cerca de 160 espécies de FMAs (INVAM, 2006), número considerado baixo quando comparado ao dos fungos ectomicorrízicos, que apresentam aproximadamente 20.000 espécies conhecidas. Parte dessas espécies encontra-se depositada no Banco de Germoplasma do INVAM (“International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi”) e também no BEG (“Banque Européenne des Glomales”). Embora esses bancos sejam considerados de referência para Glomales, não detêm a totalidade das espécies descritas. O INVAM mantém, até o momento, um total de 79 espécies (aproximadamente 50% das espécies conhecidas) sendo 34 de *Glomus*, 5 de *Entrophospora*, 14 de *Acaulospora*, 3 de *Archaeospora*, 2 de *Paraglomus*, 5 de *Gigaspora* e 14 de *Scutellospora*. Detalhes sobre a classificação e descrição das espécies podem ser encontrados no sítio do INVAM, <http://invam.caf.wvu.edu/do>

#### **4. Contribuição da Biologia Molecular para a Taxonomia e os Estudos sobre Ecologia e Diversidade de FMAs**

A condição de biotrófico obrigatório dos FMAs sempre foi o maior problema para a realização de estudos básicos sobre sua fisiologia e genética. Não sendo possível obter e manipular seu crescimento em condições de laboratório, aspectos importantes da biologia desses fungos são ainda pouco conhecidos. O conhecimento existente hoje foi obtido de indivíduos multiplicados em culturas-isca em casa de vegetação, de esporos isolados diretamente de solo coletado no campo ou mesmo extrapolado de conhecimentos adquiridos de outros fungos.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos baseados em Biologia Molecular tem oferecido possibilidades extremamente interessantes para se estudar a diversidade e ajudar a resolver problemas que envolvam afinidades filogenéticas dos FMAs. A contribuição da Biologia Molecular já pode ser vista na classificação atual, que considera aspectos moleculares para a diferenciação de gêneros e espécies (Morton & Redecker, 2001).

Conhecimentos básicos sobre fisiologia são fundamentais para o desenvolvimento, adaptação e aplicação de novos métodos de pesquisa para os FMAs. Seu desenvolvimento e produção de micélio no solo são extremamente reduzidos. Entretanto, logo que a simbiose se estabelece, o fungo produz abundante micélio dentro dos tecidos radiculares e, posteriormente, na rizosfera. Anastomoses de hifas vegetativas ocorrem em micélio de FMAs (Tommerup, 1988) e fornecem oportunidades para recombinação somática de núcleos, também durante o crescimento fúngico no córtex da raiz. Com base nessas observações, Tommerup (1988) sugere que o surgimento de incompatibilidade entre hifas de diferentes isolados pode ser devido ao distanciamento geográfico entre as espécies e poderia ser um mecanismo auxiliar para localizar diferenças genéticas entre populações de FMAs.

Como não se conhece o estágio uninucleado em FMAs, é possível assumir que hifas abriguem um conjunto heterogêneo de núcleos. Se não há reprodução sexual ou parassexual em FMAs, variações devido a mutações alélicas espontâneas

no conjunto de núcleos, em algumas espécies tenderão a tornar-se homogêneas durante repetidas divisões e esporulação. Posteriormente, poderá ser simplesmente considerado como um modo de “acondicionamento” de uma amostra de núcleos dentro de um espaço limitado. Nesse caso, a diversidade tornar-se-á importante entre espécies originadas de solos ou regiões geográficas diferentes, já que as espécies terão origem clonal, com divergência ao acaso e nenhum fluxo de gene. Mas se ocorrer reprodução sexual ou parassexual, a freqüência de substituição de nucleotídeos permanecerá a mesma, enquanto a troca de material genético será possível, ocorrendo um aumento em genótipos dentro de uma mesma espécie ou grupo.

Estimativas de números de núcleos em esporos de FMA de espécies diferentes mostram valores extremamente altos (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). Contudo, não se sabe se os núcleos dentro de um esporo originam-se de um número pequeno de núcleos que se dividiram ou se migraram diretamente do micélio vegetativo. Isso é importante porque a variação genética dependerá de núcleos. Utilizando um genótipo modelo de um locus e dois alelos, p e q respectivamente, a probabilidade da freqüência de p ou q oscilar entre 1 ou 0 será muito grande, se o número dos núcleos originais no esporo é pequeno. Assim, se existe um fenômeno de variação ao acaso na esporulação, o uso de vários ciclos de reinoculação com um só esporo, inevitavelmente, levará à clonagem de apenas um tipo nuclear (p ou q). Entretanto, se os núcleos do esporo representam a diversidade nuclear do micélio, dos quais eles são originados, repetidas reinoculações com um único esporo manterão a diversidade. A análise da divergência de nucleotídeos através de um número de gerações, começando se de um só esporo, tornará possível detectar uma eventual oscilação genética e estimar sua amplitude.

Avaliações do conteúdo de DNA dos núcleos indicam valores de 0,25 pg em *Glomus versiforme* para 0,77 pg em *Gigaspora margarita* (Bianciotto & Bonfante, 1992), mas não há informação se a amplitude de variação pode ser devido à poliploidia ou à amplificação de certas seqüências de DNA (seqüências repetitivas), sem mudanças na informação contida dentro do genoma. Estimativas de curvas de denaturação de DNA ajudam a responder essa questão (Britten & Kohne, 1968).

Os estudos sobre a fisiologia, bioquímica e genética dos FMAs são fundamentais para o entendimento do fenômeno da micorrização. Entretanto, seu completo conhecimento só será alcançado pela integração de conhecimentos e do desenvolvimento ou adaptação de novos métodos que permitam estudar a fisiologia da simbiose, estudando as estruturas fúngicas produzidas nas raízes e identificando os fungos em ambientes tão diversos como no solo e no tecido cortical das raízes.

#### 4.1 Técnicas Moleculares Aplicadas aos FMAs

Atualmente, os estudos sobre caracterização genética de FMAs estão sendo auxiliados pelo emprego de marcadores moleculares. Entre os marcadores utilizados estão a análise de isoenzimas, do perfil genômico do rDNA (DNA ribossomal) e do mtDNA (DNA mitocondrial), baseados na técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), do RFLP (polimorfismo de tamanho nos fragmentos de restrição), do RAPD (polimorfismo pela amplificação aleatória do DNA), do DGGE (gradiente desnaturante em gel de eletroforese), assim como do emprego dessas técnicas associadas.

#### 4.1.1 Análise de Isoenzimas

Isoenzimas caracterizam-se por serem proteínas codificadas por alelos diferentes de mesmo "locus" genético (aloenzimas) ou por "loci" genéticos separados, que têm a mesma atividade enzimática, mas mobilidades eletroforéticas diferentes no gel (Micales et al., 1986). Bandas de aloenzimas migram rigorosamente juntas e de isoenzimas, codificadas por "loci" diferentes, migram diferentemente no gel. O estudo das isoenzimas pode fornecer informações sobre citogenética e genética nuclear do fungo isolado.

Diversos sistemas de isoenzimas têm sido estudados em FMAs e os resultados, obtidos a partir de análises do padrão de bandas em gel, sugerem que esses fungos podem ser haplóides (Rosendahl & Sen, 1992). Como as bandas representam diretamente os genes dos fungos, podem revelar diferenças genéticas entre fungos proximamente relacionados, contribuindo para a classificação dos FMAs. A análise de isoenzimas tem sido particularmente aplicada aos membros do gênero *Glomus*. Hepper et al. (1986) relataram a expressão de um "locus" da peptidase, em micélio simbiótico, mas não em esporos, de duas espécies de *Glomus*. Variações no padrão de bandas ocorrem entre espécies e entre isolados. Observa-se diversidade genética aparente entre isolados reconhecidos como *G. mosseae* de diferentes origens geográficas, conforme relatado por Hepper et al. (1988). Entretanto, a amplitude da variabilidade da isoenzima depende muito da enzima em questão, de tal forma que uma análise genética precisa, baseada na expressão de isoenzimas, requer testes com um número grande de sistemas enzimáticos diferentes. Contudo, alguns diagnósticos de bandas de isoenzimas são estáveis sob condições variáveis de crescimento. Essa característica torna-os instrumentos potencialmente úteis para monitoramento de FMAs morfológicamente indistinguíveis em infecções múltiplas, o que pode ser uma ferramenta valiosa para estudos de dinâmica populacional (Hepper et al., 1986, 1988b; Rosendahl et al., 1989). A utilidade de padrões de variabilidade de isoenzimas associados a caracteres morfológicos, utilizados como critério taxonômico, é discutida por Rosendahl & Sen (1992).

#### 4.1.2. Análises do Perfil Genômico Baseado no DNA Recombinante

Métodos moleculares usados para estudar a diversidade microbiana ao nível de ácidos nucléicos essencialmente buscam por substituições, inserções, deleções ou rearranjos de grupos de nucleotídeos. Para os FMAs, a aplicação desses métodos era difícil devido aos problemas para obtenção de quantidades suficientes de DNA. Contudo, essa dificuldade foi contornada com o desenvolvimento da PCR (reação da polimerase em cadeia), que promove uma amplificação enzimática do DNA (Saiki et al., 1985; Mules et al., 1986). Essa técnica modificou completamente as análises de ácidos nucléicos até então realizadas, abrindo novas perspectivas aos estudos da biodiversidade e permitindo o estudo de organismos não cultiváveis, como os FMAs.

#### DNA ribossômico (rDNA)

O rDNA tem sido extensivamente utilizado em estudos filogenéticos de fungos. Na maioria dos eucariotos, incluindo todos os fungos verdadeiros, o rDNA apresenta-se como um arranjo repetitivo "em tandem" dos três maiores genes que codificam

para os diferentes tipos de rRNA, separados por espaçadores transcritos ou não (Bruns et al., 1991). As regiões gênicas de rDNA são altamente conservadas, de forma que sondas heterólogas hibridizam-se fortemente a elas. Já os espaçadores, particularmente o espaçador intergênico (IGS), podem variar na sua seqüência de maneira significativa, até mesmo intraespecificamente.

Um dos principais alvos dos estudos de variabilidade e biodiversidade em estudos genômicos são os genes ribossômicos. Esses genes multicópias são constituídos de três regiões codificadas de diferentes tamanhos (18S; 5,8S e 25-28S) separados por duas seqüências não traduzidas (ITS, espaços intragênicos transcritos). As regiões codificadas têm sido suficientemente conservadas durante a evolução e permitem o desenho de "primers" específicos para o gene ribossômico. As seqüências ITS, separando a região 5,8S da 18S e 25-28S, são variáveis e podem ser usadas para diferenciar espécies proximamente relacionadas (White et al., 1990; Lanfranco et al., 2001).

Sondas podem ser construídas pela comparação entre os padrões de variabilidade intragênicos e das regiões intergênicas. Seqüências de rRNAs (ou rDNAs) de várias subunidades dos ribossomos são regiões bastante estudadas para análises filogenéticas e desenvolvimento de sondas. Os estudos dos genes são úteis porque: 1) eles existem em cópias múltiplas e são facilmente detectados durante o procedimento de hibridização; 2) as regiões gênicas são evolutivamente conservadas e existem na literatura sondas (para hibridização) e "primers" (para PCR e análise de seqüência de nucleotídeos) que podem ser utilizadas para vários objetivos; 3) há conhecimento substancial sobre rRNA em eucariotos; 4) as regiões intergênicas adjacentes às regiões gênicas são altamente variáveis entre espécies, sendo possíveis as comparações entre "taxa" relacionados. Como as subunidades ribossomais diferem em tamanho e quantidade, as seqüências dentro da subunidade variam. Seqüências de dominantes dentro de subunidades ribossomais podem ser comparadas para identificar seqüências usadas para sondas de especificidade variada. Blanz & Unseld (1987) discutem com detalhes o domínio das subunidades ribossomais para localizar seqüências usadas para identificar fungos em diferentes níveis taxonômicos.

A natureza multicópia do rDNA repetitivo torna a região ITS de fácil amplificação em amostras de DNA pequenas, diluídas ou altamente degradadas. Alguns estudos demonstram que a região ITS é variável entre espécies de fungos que diferem na morfologia, sendo a variação intraespecífica baixa. Entretanto, existem exceções.

### **DNA mitocondrial (mtDNA)**

O DNA mitocondrial também vem sendo utilizado nos estudos de biologia molecular dos FMAs devido às seguintes características: a) possui tamanho reduzido, variando de 17 a 176 Kb; b) não apresenta metilação de bases nitrogenadas; c) possui grande número de cópias no genoma, permitindo a visualização dos fragmentos de restrição com facilidade, via hibridização com sondas de mtDNA; d) é rico em RFLP ao nível intraespecífico (Bruns et al., 1991).

Devido a essas características, o mtDNA é potencialmente útil no estudo de características genéticas e relações filogenéticas de populações ou isolados (Kim et al., 1992). Entretanto, é necessário cuidado quando são interpretadas diferenças em mtDNA de fungos.

Grande variabilidade em mtDNA pode existir entre e dentro de espécies de fungos. A elevada taxa de mutação no mtDNA é explicada pela ausência de atividade de exonuclease 3'5' como mecanismo de reparo nas polimerases das mitocôndrias. Dessa forma, a evolução do mtDNA pode ocorrer de maneira extremamente rápida.

#### **4.1.3 Técnicas Baseadas em PCR (reação em cadeia da polimerase) para Estudo do DNA Recombinante**

A técnica de PCR permite a amplificação *in vitro* de uma região de DNA situada entre dois segmentos reconhecidos por "primers". Os "primers", dispostos nas extremidades da seqüência a ser amplificada, fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da DNA-polimerase. A reação é aquecida a 90-95°C, para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 40-60°C para permitir o anelamento dos "primers" aos sítios apropriados no DNA molde e um novo aquecimento a 70-75°C para que a Taq-polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação. Nos ciclos seguintes, os "primers" irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores.

Os produtos da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose, onde os fragmentos maiores migram mais lentamente. Cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o "primer" e o DNA molde. Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo, o que é devido a diversos fatores. Alterações na seqüência de bases nas regiões complementares aos "primers" eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídeo e inserções de seqüências entre os sítios de ligação dos "primers" deixam o segmento molde maior que o limite da PCR, de forma que a amplificação não ocorre, sendo ambas as mutações reconhecidas pela ausência da banda no gel. Inserções entre os sítios de ligação dos "primers", que não ultrapassem o limite da PCR, farão com que a amplificação ocorra, mas produzindo uma banda com peso molecular maior. Por outro lado, deleções entre os sítios de ligação dos "primers" farão com que a amplificação ocorra, produzindo uma banda de peso molecular menor.

Pela PCR, quantidades em picogramas de DNA podem ser amplificadas a valores que são detectados e analisados pelos métodos de Biologia Molecular convencional. Devido ao desenvolvimento da PCR tornou-se possível analisar o DNA e caracterizar espécies a partir de pequenas quantidades de material, tal como apenas um esporo de FMA. A técnica tem aumentado muito a capacidade de analisar seqüências, que podem ser usadas para determinar variabilidade entre organismos. Além disso, após a amplificação, se as seqüências forem determinadas, poderão ser construídos "primers" específicos para aquela região. Após a amplificação da região de interesse, é possível o mapeamento da seqüência para comparação com fragmentos similares de outros indivíduos. Depois de comparados, regiões de especificidade podem ser identificadas e seqüências reconstruídas para uso como sondas (para identificação), "primers" adicionais (para PCR) para identificação individual ao nível taxonômico desejado (White et al., 1990) e sondas de DNA e RNA (Schowalter & Sommer, 1989).

### **PCR-RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)**

Essa técnica, desenvolvida por Williams et al. (1990), baseia-se na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, pela PCR, utilizando-se oligonucleotídeos de 10-15 bases como iniciadores ("primers") para amplificar o DNA genômico. Pelo RAPD é possível identificar o grau de similaridade entre genótipos, nos níveis inter e intra-específico.

A técnica RAPD difere da PCR por utilizar apenas um "primer" de seqüência arbitrária por reação, enquanto na segunda utilizam-se dois "primers" com seqüências de inserção conhecidas. A amplificação ocorre quando um "primer" dessa mesma seqüência reconhece um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, porém com orientação invertida na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR - 4Kb (Williams et al., 1990). Dependendo do "primer" usado, o padrão da banda de fragmentos de DNA varia e pode ser espécie-específico.

O RAPD é uma técnica altamente sensível a diferenças de nucleotídeos entre o "primer" e o DNA molde, incluindo diferenças em um único nucleotídeo. Além disso, marcadores RAPD podem ser mapeados para regiões do genoma que são inacessíveis para análise de RFLP, pela existência de DNA repetitivo.

Outras vantagens dessa técnica são a rapidez e o não-envolvimento de hibridação ou radioatividade. Além disso, requer pequena quantidade de DNA, não necessariamente de alta qualidade, nenhum trabalho preliminar é necessário e, finalmente, uma maior quantidade de marcadores pode ser encontrada quando comparado ao RFLP (Williams et al., 1990). É importante observar que o método requer pouco conhecimento da bioquímica ou biologia molecular das espécies em estudo.

As principais aplicações do RAPD são o mapeamento, classificação de linhagens de uma espécie, caracterização molecular de espécies, identificação de raças patogênicas, identificação de marcadores ligados a genes de interesse e estudos de genética de populações e epidemiologia.

No entanto, esse método apresenta problemas quando aplicado aos estudos dos FMAs e da micorrização. Os "primers" utilizados não são específicos e o DNA presente em qualquer organismo contaminante pode levar a amplificação de um fragmento de DNA e resultar em padrão de banda não específico. Isso é de particular preocupação para pesquisa com os FMAs. Como o fungo não pode ser produzido assepticamente, a contaminação por bactérias é difícil de ser evitada.

Além disso, esse método não pode ser usado diretamente para identificar o fungo dentro das raízes devido à interferência do DNA da planta. No entanto, resultados recentes têm mostrado que esse método é mais sensível que o uso de isoenzimas (Wang et al., 1993) e pode levar ao isolamento de fragmentos específicos de DNA para os quais podem ser gerados "primers" correspondentes. Esses "primers" poderão ser usados combinados com análise de variabilidade do PCR-RFLP ou, se espécie-específico, para detectar um determinado fungo.

### **PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho nos fragmentos de restrição)**

A técnica do RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") tem a propriedade de produzir polimorfismo resultante de diferenças específicas na seqüência de DNA, tais como a substituição, adição ou deleção de um único par de base, ou ainda grandes alterações cromossômicas, como inversão, translocação, deleção ou transposição. Essas diferenças alteram os tamanhos dos fragmentos obtidos pela digestão do DNA com endonucleases do tipo II, que posteriormente são separadas em gel de agarose por eletroforese. A análise por RFLP detecta variações nas regiões homólogas a uma sonda (fragmento de DNA marcado radioativamente) e próximas a ela. Por atuar de maneira codominante, marcadores RFLP distinguem genótipo homocigoto de heterocigoto, fornecendo o máximo de informação sobre ligação gênica a partir dos dados de segregação.

Entre as aplicações do RFLP, Michelmores & Hulbert (1985) citam: obtenção de mapas genéticos saturados, permitindo enumeração e distribuição dos genes determinantes de caracteres quantitativos (QTL), estudo da organização e evolução do genoma fúngico, identificação de genes específicos, estudos de genética de população, epidemiologia, taxonomia e relação filogenética.

O RFLP permite caracterizar genótipos e espécies de maneira precisa e refinada e tem contribuído substancialmente para a genética e para a sistemática de plantas, animais e microrganismos, especialmente quando combinado com informações obtidas por estudos clássicos. Apesar de sua eficiência, a análise de RFLP apresenta alguns problemas para aplicação rotineira. Ela requer grandes quantidades de DNA de alta qualidade e necessita de várias manipulações experimentais de alto custo.

A análise de RFLP inicia-se com a produção de fragmentos de restrição isolados de DNA por digestão do ácido nucléico com endonucleases de restrição que reconhecem seqüências específicas, normalmente palindrômicas (usualmente 4 a 6 bases consecutivas) em dupla fita de DNA (dsDNA). Fragmentos resultantes variam de uns poucos pares de nucleotídeos a mais de 25 kilobases (kb). A alta variabilidade em número e tamanho do fragmento de restrição visível em uma sonda de RFLPs impede a interpretação sem o uso de uma sonda (fragmento de DNA selecionado). Os fragmentos de RFLP são usualmente hibridizados com sondas lábeis, para reduzir o número de fragmentos usados na análise e simplificar o procedimento de identificação. São analisados após separação em seu RFLP característico por eletroforese em gel. Dependendo do uso do RFLP, pode ser analisado com digestão simples com uma endonuclease, digestão simples com mais de uma enzima ou coleção de RFLPs individuais produzidos pela digestão simples com diferentes enzimas.

### **DGGE (gradiente de desnaturação em gel de eletroforese)**

A técnica de DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) foi originalmente desenvolvida e aplicada em pesquisas médicas para detecção de mutação de ponto (Myers et al., 1987), sendo recentemente introduzida em estudos de ecologia microbiana (Muyzer et al., 1993). Na eletroforese em gel de poliacrilamida sujeito a gradientes químicos (DGGE), fragmentos de DNA de mesmo tamanho e seqüências



nucleotídicas diferentes (regiões hipervariáveis do rDNA 16S, por exemplo) podem ser separados por eletroforese, de acordo com suas propriedades de desnaturação. Essa separação se baseia no princípio físico de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula, com respeito a sua conformação que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou em fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, compostas por partes em dupla hélice e partes em fitas simples, ao acaso, movimentam-se mais lentamente no gel do que as moléculas em fita dupla ou simples. Quando o DNA é submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita até que atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula, chamados "melting domains". Esses domínios são caracterizados por possuírem temperaturas de desnaturação idênticas, o que faz com que, a determinada temperatura, ocorra a desnaturação completa desses domínios, situados ao longo da molécula. Quando um domínio se desnatura, processa-se uma transição na conformação da molécula que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e, nessa condição, a migração da molécula no gel praticamente cessa. Variações nas seqüências nucleotídicas dos domínios levam a diferença nas temperaturas desnaturantes, fazendo com que as moléculas com diferentes seqüências parem de migrar em diferentes posições no gel. Pela análise da migração do DNA no gel é possível estabelecer relações entre os organismos.

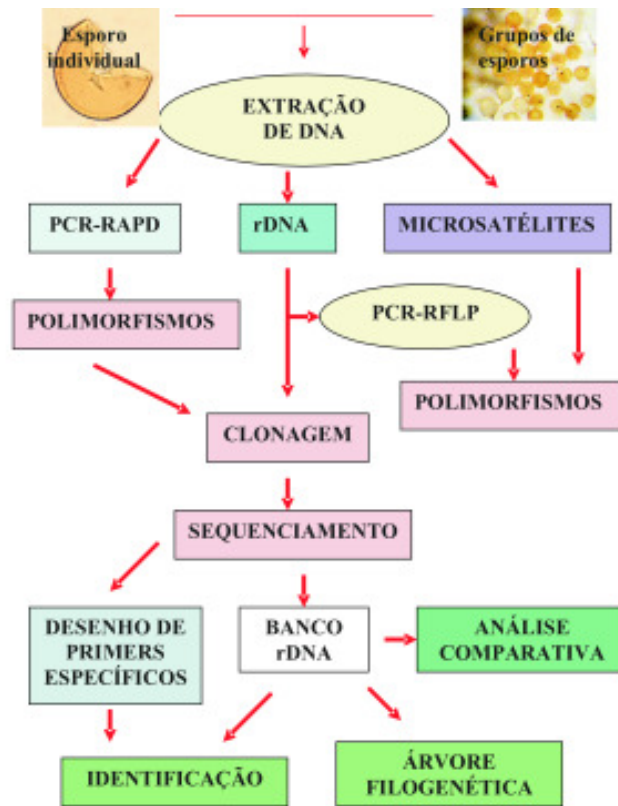
Essa técnica tem sido aplicada com sucesso no estudo de comunidades microbianas complexas (Muyzer et al., 1993), de grupos microbianos específicos tais como cianobactérias (Nübel et al., 1997), no monitoramento de mudanças ocorridas em comunidades devido variações ambientais (Colores et al., 2000) e várias outras aplicações relacionadas a presença e atividade de microrganismos no solo.

Essa técnica foi aplicada ao estudo da micorrização por Kowalchuk et al. (2002), que usaram com sucesso esporos coletados na rizosfera de *Ammophila arenaria* e raízes colonizadas, para estudar a dinâmica populacional de fungos micorrízicos na rizosfera. Baseado nos resultados obtidos, os autores indicam que esta metodologia pode ser aplicada aos FMAs como uma ferramenta auxiliar no estudo da micorrização.

## **5. Contribuição da Biologia Molecular para a Taxonomia e Estudos de Ecologia de FMAs**

Atualmente, o estudo da ecologia de FMAs tem sido auxiliado pelo desenvolvimento ou adaptação de técnicas utilizadas em estudos de biologia molecular. Métodos baseados na tecnologia do DNA recombinante têm se mostrado como ferramentas poderosas na distinção entre isolados de FMAs, sendo capazes de detectar essas diferenças tanto ao nível de esporos coletados no solo quanto em micélio e estruturas fúngicas presentes em raízes colonizadas.

Uma visão geral das principais técnicas e/ou estratégias moleculares utilizadas com esporos de FMAs são apresentadas na Figura 1.



**Figura 1.** Principais técnicas moleculares empregadas em estudos com esporos de fungos micorrízicos arbusculares.

Simon et al. (1992, 1993 a,b) foram os primeiros a aplicar técnicas de PCR para FMAs em um estudo de codificação genética de uma pequena subunidade do rRNA. Da seqüência completa do 18S de duas espécies de FMA (*Glomus intraradices* e *Gigaspora margarita*) desenharam um “primer” (VANS1) que, quando usado em combinação com “primers” universais, somente amplificam Glomales. Esse “primer” simplificou os trabalhos subseqüentes, pois, por ser específico, eliminou o problema de eventuais amplificações de DNA de organismos endospóricos ou associados aos FMAs. Simon et al. (1993) desenvolveram novos “primers” potencialmente úteis para serem utilizados como sondas táxon específicas. Baseando-se na amplificação com o “primer” VANS1, determinaram diferenças nas seqüências de DNA de três famílias e uma espécie de FMA, o que possibilitou desenhar os “primers” VAGLO, VAACAU, VAGIGA e VALETC, respectivamente para *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* e *G. etunicatum*. A especificidade desses quatro “primers”, quando utilizados em conjunto com o “primer” VANS1 (específico para Glomales) foi testada em amplificações de um grande número de outros fungos endomicorrízicos. Posteriormente, outros primers ou sondas de regiões desse mesmo gene puderam ser desenhadas para discriminar até doze diferentes FMAs (Simon et al., 1993a). A variabilidade ou similaridade nestas

seqüências foram usadas para analisar relações filogenéticas entre os fungos, com base no fato de que a taxa de substituição de nucleotídeos é correlacionada com a divergência entre as espécies. A árvore filogenética resultante foi coincidente com a classificação dos FMAs, estabelecida pela morfologia dos esporos.

Isto representa um avanço na pesquisa com os FMAs, uma vez que abre possibilidades para, ajustados os problemas próprios da técnica, usá-la de maneira rápida e segura para a identificação de esporos coletados diretamente na rizosfera.

Entretanto, essa estratégia para a identificação de FMA na rizosfera é dependente da disponibilidade de seqüências conhecidas de todas as espécies a serem identificadas. Até o momento, as seqüências 18S são disponíveis apenas para 12 espécies de FMAs. Com o avanço das pesquisas, laboratórios mais equipados e maior treinamento de técnicos será possível que, no futuro, isso não seja uma limitação. Entretanto, métodos ou estratégias que possam ser utilizadas para caracterizar FMA sem o conhecimento prévio de suas seqüências de DNA serão certamente mais aplicáveis.

Marcadores moleculares que objetivam genes ribossomais têm fornecido novas informações para a identificação de esporos individuais, um importante passo na pesquisa sobre diversidade de espécies de FMAs na rizosfera de comunidades naturais (Clapp et al., 1995; Sanders et al., 1995, 1996; Dood et al., 1996). Sanders et al. (1995) desenvolveram um protocolo para amplificação por PCR com os primers universais ITS 1 e ITS4, seguido por RFLP para caracterizar a região de ITS do DNA extraído de um único esporo de FMA. A região ITS, que tem aproximadamente 600bp de tamanho, mostrou claras diferenças entre espécies, mas somente após RFLP. O padrão de restrição foi reproduzível para esporos individuais de uma única espécie. Entretanto, quando a técnica foi aplicada em esporos originários de outro local, os resultados foram muito mais complexos: dez esporos individuais pertencentes ao mesmo grupo morfológico de *Glomus* produziram dez padrões de bandas de ITS diferentes, sugerindo uma alta diversidade genética entre os esporos individuais (Sanders et al., 1995).

Resultados semelhantes foram observados por Colozzi-Filho & Cardoso (Dados não publicados). Estes autores, trabalhando com esporos de *Entrophopora infrequens* observaram duas regiões de ITS em um grupo de 14 esporos de mesma morfologia e procedência, quando o DNA foi amplificado por PCR com primers ITS 4 e 5 combinados.

Uma terceira variante de ITS foi encontrada por Franken & Gianinazzi-Pearson (1996), pelo seqüenciamento de um clone ribossomal de uma biblioteca de fagos de *G. mosseae*. Lloyd-MacGilp et al. (1996) citam que a heterogeneidade de ITS é normal dentro de esporos de *Glomus*. Eles obtiveram duas seqüências em DNA proveniente de esporo único de três isolados de *G. mosseae* e um isolado de *G. dimorphicum* e três seqüências de esporo único de *G. coronatum*. Os autores observam que a variação entre seqüências de isolados de continentes distantes foi menor que a variação observada entre regiões geográficas menores. Ainda concluíram que as seqüências variantes têm evoluído, em uma escala longa de tempo, em relação à taxa com que esses fungos se espalharam pelo mundo.

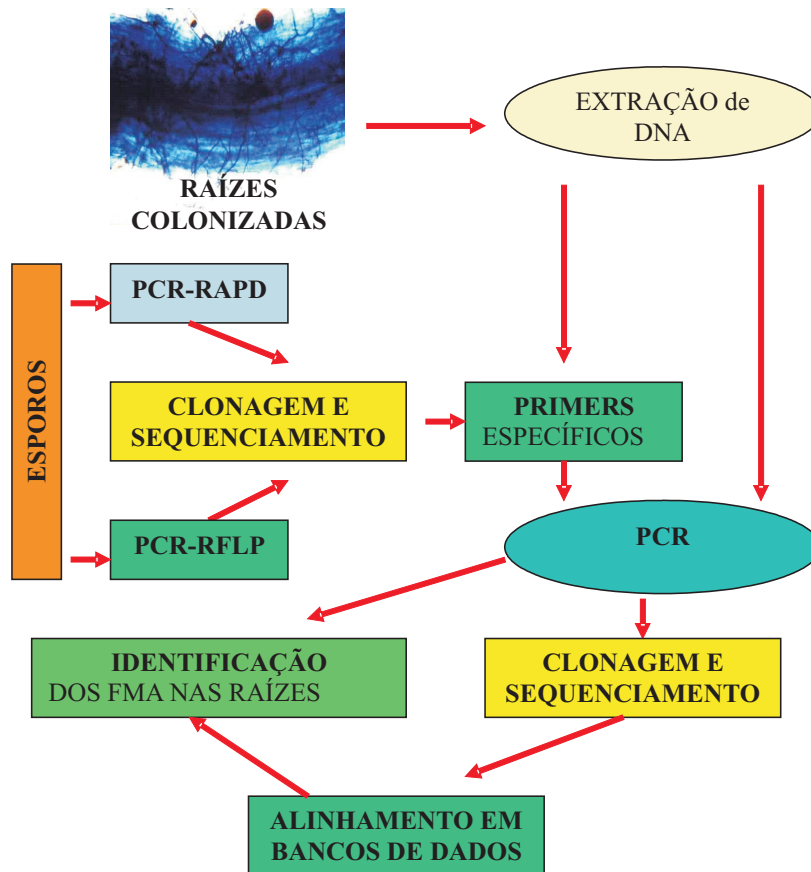
Alguns dados recentes obtidos para *Gigasporaceae* têm mostrado uma situação similar para essa família. Três seqüências de ITS foram identificadas, pela clonagem dos fragmentos de ITS amplificados de *Gigaspora margarita* e *Gigaspora rosea* (Lanfranco et al., 1999; Lanfranco et al., 2001).

Outra ferramenta molecular utilizada para identificar FMAs durante a fase de esporos e a fase simbiótica é o RAPD. Nessa técnica, oligonucleotídeos pequenos e arbitrários são usados como “primers” para a amplificação de DNA extraído de esporos ou raízes colonizadas. A análise de RAPD é uma ferramenta bastante sensível para a detecção de diferenças genéticas entre indivíduos. Wyss & Bonfante (1993) aplicaram pela primeira vez essa estratégia em esporos de FMAs e observaram que a similaridade nos perfis da banda obtida depois da amplificação pelo RAPD foi maior nos esporos do mesmo isolado e menor entre espécies diferentes. A vantagem desse método é que ele não requer o conhecimento prévio da seqüência do DNA, porque os fragmentos de DNA são amplificados aleatoriamente. No entanto, esse método apresenta alguns problemas. Os “primers” utilizados não são específicos e o DNA presente em qualquer organismo contaminante pode levar à amplificação de um fragmento de DNA e resultar em padrão de banda não específico. Isso é particularmente preocupante para pesquisas com FMAs. Como o fungo não pode geralmente ser produzido assepticamente, a contaminação por bactérias é difícil de ser evitada. Além disso, esse método não pode ser usado diretamente para identificar o fungo dentro das raízes, devido à interferência do DNA da planta. Contudo, resultados têm mostrado que esse método é mais sensível que o uso de isoenzimas (Wang et al., 1993) e pode levar ao isolamento de fragmentos específicos de DNA, para os quais “primers” correspondentes podem ser gerados. Lanfranco et al. (1995) identificaram uma banda não polimórfica como um marcador para 8 isolados de *Glomus mosseae*. O fragmento, com aproximadamente 650 bp de comprimento, foi clonado e seqüenciado, e um par de “primers” específicos desenhado (Lanfranco et al., 1997). Esses “primers” especificamente amplificaram não somente DNA de esporos de *Glomus mosseae*, mas também de raízes de maçã, trevo, alho e cebola colonizadas com isolados de *G. mosseae*. Além disso, eles distinguiram *G. mosseae* de *Glomus coronatum*, espécies estreitamente relacionadas, o que mostra as possibilidades dessa estratégia para a detecção e identificação de FMAs.

Outra possibilidade de estudar a variabilidade genética de FMAs é o estudo de seqüências altamente repetidas que ocorrem no genoma do fungo. Essa ocorrência foi estudada por Longato & Bonfante (1997), usando primers desenhados em seqüências de microsatélites, como (CT), (GACA), (TGTC), para obter perfis de amplificação espécie-específica. Zezé et al. (1996) isolaram uma seqüência altamente repetitiva de uma biblioteca genômica parcial de *Scutellospora castanea*. Esse fragmento de DNA mostrou ser específico para essa espécie pela hibridização em *Southern blot* e por PCR com oligonucleotídeos derivados da seqüência.

A identificação dos FMAs dentro do tecido do hospedeiro é importante para estudos ecológicos e de determinação de eficiência simbiótica de FMAs. Entretanto, esses estudos são de difícil realização e nenhum método de identificação morfológica foi satisfatoriamente aplicado (Abbott & Gazey, 1994). A discriminação morfológica entre os isolados pode ser possível no nível de gênero, quando a morfologia das hifas

e das estruturas fúngicas produzidas internamente às raízes são diferentes entre os fungos. Estudos sobre interações competitivas entre fungos coexistentes em raízes requerem o uso de métodos mais sensíveis, tais como os que envolvem Biologia Molecular. Na figura 2 são apresentadas as principais técnicas e estratégias para o estudo da colonização radicular baseado em Biologia Molecular.

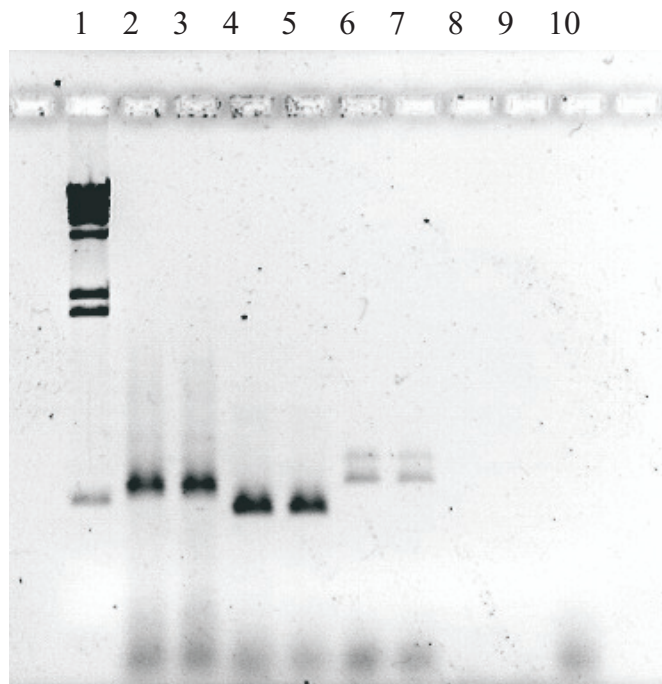


**Figura 2.** Principais técnicas moleculares empregadas em estudos com raízes colonizadas por FMAs.

Os primeiros relatos sobre a possibilidade de identificação de FMAs internamente às raízes foram feitos por Simon et al. (1993b), que desenharam “primers” específicos para *Glomus vesiculiferum* e conseguiram amplificá-lo com sucesso em raízes colonizadas. Entretanto, essa estratégia para a identificação de FMAs nas raízes depende da disponibilidade de seqüências conhecidas de todas as espécies a serem identificadas. Todavia, as seqüências 18S disponíveis ainda são poucas. Bonito et al., (1995) mostraram que a utilização dos “primers” VANS1 e NS21 para a amplificação de *Glomus intraradices* em raízes colonizadas pode ser eficiente para várias espécies de plantas hospedeiras. Não entanto, outros estudos verificaram que os sítios dos “primers” VANS1 podem não ser bem conservados para todos os grupos de FMAs (Clapp et al., 1999; Redecker et al., 2000; Schübler et al., 2001).

Clapp et al. (1995) usaram PCR e “primers” gênero-específicos desenhados do 18S rDNA para investigar a composição fúngica de raízes micorrizadas coletadas do campo. Eles introduziram a técnica do enriquecimento seletivo de DNA amplificado (SEAD), baseada no princípio da hibridização subtrativa, para remover as interferências do DNA derivado das plantas. Três gêneros de FMAs, *Acaulospora*, *Scutellospora* e *Glomus* foram detectados em raízes de gramíneas. Embora a presença dos dois primeiros gêneros fosse esperada, baseando-se no fato de que esporos foram encontrados no solo ao redor das raízes, esporos de *Glomus* foram raros na rizosfera, sugerindo que a presença endofítica de FMAs pode não ser correlacionada com sua presença no solo. A limitação dessa técnica é que somente são discriminados os fungos ao nível de gênero. Lanfranco et al. (1995), a partir de PCR-RAPD, identificaram uma banda não polimórfica como um marcador para *Glomus mosseae* e seqüenciaram um par de “primers” específicos que amplificaram DNA de *G. mosseae* em raízes de maçã, trevo, alho e cebola, colonizadas com isolados de *G. mosseae*. A limitação prática desse método é a utilização de “primers” específicos, que limitam os estudos à disponibilidade de “primers” previamente desenhados.

No Brasil, Colozzi Filho & Cardoso (2000) utilizaram “primers” de ITS 4 e 5 combinados, para amplificar raízes de cafeeiro colonizadas e estudar a dinâmica populacional dos FMAs nativos (Figura 3).



**Figura 3.** Produto de amplificação de PCRs obtidos de extrato cru de esporo único de fungos micorrízicos arbusculares e de raízes de cafeeiro colonizadas ou não, usando os primers ITS 4 e 5 combinados. Linha 1, marcador molecular I digerido com *HindIII*; Linhas 2 e 3, *Acaulospora longula*; Linhas 4 e 5, *Scutellospora gilmorei*; Linhas 6 e 7, extrato de raízes colonizadas (dil. 1:100); Linhas 8 e 9, extrato de raízes não colonizadas (dil. 1:100); Linha 10, Controle (sem DNA e sem diluição). Fonte: Colozzi Filho & Cardoso (2000).

Segundo os autores, a comparação entre as bandas de ITS obtidas da raiz colonizada com as bandas obtidas de esporos coletados na rizosfera permitiu concluir que a presença do esporo na rizosfera não é um indicativo seguro de sua presença colonizando a raiz. Nesse caso foi possível detectar no nível molecular que *Scutellospora gilmorei*, isolado na rizosfera do cafeeiro, não estava efetivamente colonizando suas raízes.

Lanfranco et al. (1999) testaram nove isolados de diferentes espécies de *Gigaspora*; desenharam os “primers” específicos GilTS1 e GilTS2 para a espécie *G. margarita* e confirmaram sua especificidade testando-os com todos os isolados e obtendo sucesso na amplificação somente do DNA de *G. margarita*. Novamente Lanfranco et al. (2001) estudaram outros isolados de *Gigaspora*, inclusive um isolado do Brasil, e desenharam mais dois novos “primers”, com base nos alinhamentos das seqüências. Quando se utilizou conjuntamente os “primers” GilTS1/GiR2, observou-se amplificação de *G. gigantea* e *G. rosea*, em contraste com os primers GilTS1/GiR3, que somente amplificaram produtos de esporos de *G. rosea*. Esses “primers” específicos foram testados em raízes de *Araucaria angustifolia* e trifólio colonizadas por *G. margarita* e *G. rosea* e sua especificidade foi confirmada.

Kowalchuk et al. (2002) utilizaram a técnica do PCR-DGGE para o estudo de comunidades de FMAs associadas a gramíneas crescendo em dunas de areia na Holanda. Os autores citam que essa estratégia conseguiu detectar e identificar espécies de FMAs no solo e nas raízes colonizadas, sem o uso de culturas- armadilha. Foram detectadas seqüências de *Glomus* e *Scutellospora*, incluindo uma nova espécie de *Glomus*. Foram observadas diferenças entre a comunidade de fungos dominantes, detectada em áreas contendo plantas saudáveis e plantas degeneradas. Os autores observaram também diferenças entre a comunidade de fungos no solo e a comunidade de fungos colonizando as raízes, avaliada pela análise do 18S rDNA dos esporos e das raízes colonizadas. Esses resultados reforçam que a diversidade de esporos na rizosfera pode não representar a estrutura da comunidade que está colonizando as raízes.

A partir de DNA de raízes de *Araucaria angustifolia* colonizadas por FMAs e amplificado com os “primers” AM1/NS31, foi possível verificar a presença de espécies como *Acaulospora* sp, *Glomus fasciculatum*, *Glomus* sp. colonizando um mesmo segmento de raiz, além de outros fungos não micorrízicos (Moreira et al., 2005)

Portanto, PCR baseado em marcadores moleculares para a identificação de FMAs permite a investigação de sua diversidade na rizosfera e dentro das raízes e a elaboração de uma árvore filogenética. Esses métodos também têm aberto caminhos para o entendimento da genética dos FMAs.

## 6. Necessidade de Pesquisas Futuras

Apesar do grande avanço na utilização das técnicas de Biologia Molecular para a taxonomia e os estudos de ecologia dos FMAs, obtidos nos últimos anos, alguns problemas básicos da técnica precisam ainda ser resolvidos.

Por exemplo, é preciso aperfeiçoar protocolos de extração de DNA de esporos e raízes, que possibilitem aumentos na frequência de ampliações de material (esporos e raízes colonizadas) coletado no campo. Até hoje a frequência de ampliações obtidas a partir de DNA coletado desses materiais é baixa (Harris, 1996), problema possivelmente ocasionado pela presença de substâncias inibitórias de natureza desconhecida, que permanecem na solução após a extração do DNA e não são facilmente removidas, mesmo com o uso de muitas lavagens em água e aplicação de resinas iônicas.

A quantificação do DNA fúngico em amostras de raízes pode ser uma ferramenta auxiliar na interpretação da eficiência simbiótica, quando várias espécies colonizam raízes simultaneamente. As relações competitivas entre os FMAs poderão ser investigadas quando for possível quantificar, nas raízes, a presença de um genoma de fungo em relação a outro.

## 7. Considerações Finais

O desenvolvimento de técnicas baseadas na PCR tem permitido conhecer melhor a genética dos FMAs e elaborar uma árvore filogenética que mostra, cada vez mais, inesperada variabilidade. Pela identificação de polimorfismos, informações sobre diversidade de FMAs na rizosfera e internamente às raízes têm mostrado que ela é maior do que se conhecia. Além de possibilitar um estudo mais detalhado da diversidade, as técnicas de Biologia Molecular abrem possibilidades de investigação da diversidade de FMAs nas raízes, o que até então não era possível com os métodos tradicionais disponíveis. Também, pelas estratégias moleculares que utilizam métodos combinados, as interações dos FMAs com outros organismos da rizosfera poderão ser estudadas, revelando um futuro promissor para o entendimento das relações microbianas na rizosfera.

Detalhes técnicos de métodos que estão sendo usados precisam ainda ser discutidos e melhorados para resolver problemas específicos da pesquisa sobre micorrizas. Também é preciso investir em equipamentos e treinamento, o que possibilitará, num futuro próximo, a integração de diferentes conhecimentos sob a ótica da Biologia Molecular. Apesar das limitações, a aplicação das técnicas baseadas na PCR tem fornecido uma contribuição valorosa para o estudo dos FMAs e o entendimento da micorrização.

## Referências

- ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. **Plant and Soil**, v.159, p.69-78, 1994.
- ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; SILVEIRA, A.P.D. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. **Applied Soil Ecology**, v.26, p.123-131, 2004.



- BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhiza and crops. **Advances in Plant Pathology**, v.9, p.167-189, 1993.
- BENTIVENGA, S.P.; MORTON, J.B. Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.98, p. 419-26, 1994
- BERCH, S.M.; TRAPPE, J.M. A new species of Endogonaceae, *Glomus hoi*. **Mycologia**, v.77, p.654-657, 1985.
- BHATTARCHARJEE, M. MUKERJI, K.G.; TEWARI, J.P; SKOROPAD, W.P. Structure and hyperparasitism of a new species of *Gigaspora*. **Transactions of Brit. Mycol. Soc.**, v.78, p.184-188, 1992
- BIANCIOTTO, V.; BONFANTE, P. Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycol. Res.**, v.96, p.1071-6, 1992.
- BLANZ, P.A.; UNSELD, M. Ribosomal RNA as a taxonomic tool in mycology. **Stud. Mycol.**, v.30, p.247-58, 1987.
- BONITO, R.D.; ELLIOT, M.L.; DES JARDINS, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 2809-10, 1995.
- BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. **Science**, v.161, p.529-40, 1968.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology System**, v.22, p.525-64, 1991.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja-Rhizobium. **R. Bras. Ci. Solo**, v.9, p.125-30, 1985.
- CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCON-AGUILAR, C. & BAREA, J.M. eds. **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities. p.304-6, 1996.
- CLAPP, J.P.; YOUNG, J.P.W.; MERRYWEATHER, J.W.; FITTER, A.H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist**, v.130, p.25966, 1995.
- COLORES, G.M.; MACUR, R.E.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2959-64, 2000.
- COLOZZI-FILHO, A.; CARDOSO, E.J.B.N. Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.35, n.10, p.2033-42, 2000.
- DOOD, J.C.; ROSENDAHL, S.; GIOVANNETTI, M.; BROOME, A.; LANFRANCO, L.; WALKER, C. Inter and intraespecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. **New Phytologist**, v.133, p. 113-22, 1996.
- FRANCIS, R.; READ, D.J. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1301-9, 1995.

FRANKEN, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Construction of genomic phage libraries of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Scutellospora castanea* and isolation of ribosomal genes. **Mycorrhiza**, v.6, p.167-73, 1996.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, A.J. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, n.1, p.165-7, 1989.

GASPAR, M.L., POLLERO, R.J., CABELLO, M.N. Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **J. Am. Chem. Soc.** v.71, p. 449-45, 1994.

GERDEMANN, J.W. Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections. *Mycologia*, 47:619-632, GIOVANNETTI, M., GIANINAZZI-PEARSON, V. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.98, p.703-15, 1994.

HARRIS, W.J. Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments. **BioTechniques**, v.21, p.463-71, 1996.

HEPPER, C.M.; AZCON-AGUILAR, C.; ROSENDAHL, S.; SEN, R. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). **New Phytol.** v.110, p.207-15. 1988b.

HEPPER, C.M.; SEN, R.; AZCON-AGUILAR, C.; GRACE, C. Variation in certain isozymes among different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus monosporum* and *Glomus mossae*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.51-9, 1988.

HEPPER, C.M.; SEN, R.; MASKALL, C.S. Identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the bases of enzyme mobility during polyacrilamide gel eletrophoresis. **New Phytol.**, v.102, p.529-39, 1986.

INVAM (2005) International Culture Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Species Description. Morgantown, West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station. Home page. [[http:// invam.caf.wvu.edu](http://invam.caf.wvu.edu)]

JABAJI-HARE, S. Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. **Mycologia**, v.80, p.622-629, 1988.

KOWALCHUK, G.A.; SOUZA, F.A.; VAN VEEN, J. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v.11, p.571-81, 2002.

LANA, M.M.; ZAMBOLIN., DO VALE; FX.R.; DOS SANTOS, J.M. Tolerância do cafeeiro (*Coffea arabica*) ao nematóide *Meloidogyne exigua* inducida por fungos micorrízicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.50-53, 1991.

LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; LONGATO, S.; MELLO, A.; COMETTI, V.; BONFANTE, P. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In; Varma, A. (ed.). **Manual for mycorrhizae**. Springer Verlag, Berlin. p.47-62, 1997.

LANFRANCO, L.; BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; SOUZA, M.; MORTON, J.B.; BONFANTE, P. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytol.**, v.152, p.169-79, 2001.

- LANFRANCO, L.; DELPERO, M.; BONFANTE, P. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Molecular Ecology**, v.8, p.37-45, 1999.
- LANFRANCO, L.; WYSS, P.; MARZACHI, C.; BONFANTE, P. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Ecology**, v.4, p.61-8, 1995.
- LLOYD-MACGILP S.A., CHAMBERS, S.M., DODD, J.C., FITTER, A.H., WALKER, C., YOUNG, J.P.W. Diversity of the internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.133, p.103-11, 1996.
- LONGATO, S., BONFANTE, P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. **Mycological Research**, v.101, p. 425-32, 1997.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 1986.
- MICALES, J.A.; PONB, M.R.; PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. **Mycotaxon**, v.27, p.405-9, 1986.
- MICHELMORE, R. W.; HUMBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.25, p.383-404.1987.
- MISHLER, B.D.; BRANDON, R.N. Individuality, pluralism, and the phylogenetic species concept. **Biol. Phil.**, v.2, p.397-414, 1987.
- MOREIRA, M.; GOMES, J.E.; TSAI, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Identificação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em raízes de *Araucária angustifolia* através de métodos moleculares. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Recife, 2005. Cd-Rom.
- MORTON, J. B Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro and microevolutionary processes. **Mycotaxon**, v.37, p.493-515, 1990a
- MORTON, J.B. & BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, tow new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.471-494, 1990b.
- MORTON, J.B. Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. **Mycorrhiza**, v.2, p.97-109, 1993.
- MORTON, J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi; classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon**, v.32, p.267-324, 1988.
- MORTON, J.B., REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, v.93, n.1, p.181-195, 2001.
- MOSSE, B. Fruitifications associated with mycorrhizal strawberry roots. **Nature**, v.171, p.974, 1953.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.K.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Quant. Biol.**, v.51, p.263-73, 1986.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEM, A. C. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

MYERS, R.M., FISCHER, S.G., LERMAN, L.S., MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-45, 1985.

NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5636-43, 1996.

OEHL, F., SIEVERDING, E. *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes*. **Journal of Applied Botany**, v.78, p.72-82, 2004.

PACOVSKY, R.S. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. **Plant Soil**, v.95, p.379-388, 1986.

PAULA, M.A., SIQUIERA, J.D., OLIVEIRA, L.H., OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. **R. Bras. Ci. Solo**, v.12, p.25-31, 1988.

PEROTTO, S.; NEPOTE FUS, P.; SALTEA, L.; BANDI, C.; YOUNG, J.P.W. Diverse introns in the nuclear ribosomal genes of ericoid mycorrhizal fungi include elements with sequence similarity to endonuclease-coding gene. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, p.44-59, 2000.

PIROZYNSKI, KA., DALPÉ, Y. Geological history of Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. **Symbiosis**, v.7, p.1-36, 1989.

ROSENDAHL, S. Comparison of spore cluster forming *Glomus* species (Endogonaceae) based on morphological characteristics and isoenzyme banding patterns. **Opera Botanica**, v.100, p.215-23, 1989.

ROSENDAHL, S.; SEN, R. Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J.; VARMA, A. K. (Ed.) **Methods in microbiology**. New York: Academic Press, 1992. p.169-194.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T. Enzymatic amplification of the beta globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-4, 1985.

SANCHOLLE, M., DALPÉ, Y. Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. **Mycotaxon**, v.39, p.187-193, 1993.

SANDERS, I.R., ALT, M., GROPE, K., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**, v.130, p.419-27, 1995.

SANDERS, I.R., CLAPP, J.P., WIEMKEN, A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.133, p.123-34, 1996.

- SCHENK, N.C.; PEREZ, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Gainesville: University of Florida, 1988. 242p.
- SCHOWALTER, D.B.; SOMMER, S.S. The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v.177, p.90-4, 1989.
- SCHÜBLER, A., SCHWARZOTT, D., WALKER, C. A new fungal phylum the Glomeromycota: evolution and phylogeny. **Mycological Research**, v.105, p.1413-1421, 2001.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, v.363, p.67-68, 1993a.
- SIMON, L.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single strand conforming polymorphism polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.4211-15, 1993b.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.291-5, 1992.
- STUBBLEFIELD, S.P., Taylor, T.N. Recent Advances in Paleomycology. **New Phytologist**, v.108, p.3-25, 1988.
- SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G.S. & LINDERMAN, R.G. eds.: **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison, ASA Special Publication, 1992. p.101-124.
- TOMMERUP, I.C. The vesicular arbuscular mycorrhizas. **Adv. Plant Path.**, v.6, p.81-91, 1988.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., KLIRONOMOS JN, URSIC M, MOUTOGLIS P, STRETWOLF-ENGEL R, BOLLER T, WIEMKEN A, SANDERS IR Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, v.369, p.69-72, 1998.
- WALKER, C.; BLASZKOWSKI, J.; SCHWARZOTT, D.; SCHÜBLER, A. *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and *Gerdemanniaceae* fam. Nov., a new family in the *Glomeromycota*. **Mycological Research**, v.108, p.707-718, 2004.
- WALKER, C.; TRAPPE, J.M. Names and epithets in the *Glomales* and *Endogonales*. **Mycol. Research**, v.97, p.339-344, 1993.
- WANG, G.; WHITTAM, T.S.; BERG, M.; BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than the multilocus enzymes electrophoresis for distinguishing related bacteria strains. **Nucleic acids Res.**, v.21, p.5930-5, 1993.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) **PCR protocols: a guide to methods and application**. New York: Academic Press, 1990, p.315-322.
- WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.22, 6531-5, 1990.

WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, v.97, p.1351-57, 1993.

ZEZE, A.; HOSNY, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DULIEU, H. Characterisation of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in plant. **Applied and environmental Microbiology**, v.62, p.2443-8, 1996.

# Capítulo 9

## Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio

Lucia Vieira HOFFMANN <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é a conversão de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), catalisada por organismos vivos. Todos os organismos fixadores de nitrogênio, chamados de organismos diazotróficos, são procariotos e utilizam para a fixação a enzima conhecida como nitrogenase. Essa enzima é sensível ao oxigênio, que pode destruí-la irreversivelmente. Essa reação é endergônica, isto é, a amônia é mais rica em energia que o nitrogênio atmosférico, e para que a reação ocorra é necessário fornecimento de energia, armazenada na forma de ATP.

A FBN não é um processo realizado constantemente pelos organismos fixadores, mas ocorre apenas quando for insuficiente a concentração de nitrogênio fixado, pois o gasto de energia para FBN é alto, e quando a concentração de  $O_2$  for baixa, pois este pode inativar a nitrogenase.

A biologia molecular da FBN é um assunto complexo, pois envolve vários processos bioquímicos ou de regulação gênica, além de haver diferenças importantes entre os vários organismos até hoje estudados. O objetivo desse capítulo é oferecer ao leitor um esboço geral dos fatores essenciais para a fixação, destacando alguns dos mecanismos responsáveis pela regulação da FBN, dando especial enfoque à pesquisa realizada no Brasil.

### 2. Diversidade dos Microrganismos Diazotróficos

As bactérias diazotróficas podem ser simbiontes mutualísticos, como rizóbios, *Frankia*, líquens e *Anabaena*, ou de vida livre, como cianobactérias, *Beijerinckia* e *Clostridium*.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa em Algodão, R. Oswaldo Cruz, 1143, CEP- 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: hoff@cnpa. embrapa. br

Algumas espécies de vida livre são freqüentemente encontradas em associação com raízes de plantas e, devido à sua habilidade de interferir na morfologia das raízes e crescimento das plantas, podem ser consideradas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). Algumas sobrevivem bem tanto na superfície e interior das raízes como no solo e podem ser chamadas de endofíticas facultativas. O principal exemplo são as bactérias do gênero *Azospirillum*. Outras não sobrevivem bem no solo, mas sim no interior de raízes e parte aérea das plantas, sendo então chamadas de endofíticas obrigatórias, como *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Baldani et al., 1997; Baldani & Baldani, 2005).

As bactérias fixadoras de nitrogênio não pertencem a um único grupo filogenético. Segundo classificação a partir do seqüenciamento de RNA ribossômico (Woese, 1987), existem bactérias fixadoras de nitrogênio em proteobactérias, cianobactérias, *Campylobacter*, bactérias Gram positivas e bactérias verdes do enxofre, além de vários grupos dentro de arqueobactérias (Figura 1). É dentro dos subgrupos de proteobactérias, estão as mais estudadas: no subgrupo alfa estão *Rhizobium* e *Azospirillum*, no subgrupo beta está *Herbaspirillum* e no subgrupo gama, *Klebsiella* e *Azotobacter* (Rudnick et al., 1997).

Diante da diversidade de grupos de procaríotos que desenvolveram a capacidade de fixar nitrogênio, pode-se questionar se teriam evoluído a partir de um ancestral comum, anterior à diversificação desses grupos. Parece ser esse o caso, pois a filogenia feita a partir do seqüenciamento de *nifH*, que codifica uma das subunidades da nitrogenase, segue aquela dada pelo seqüenciamento de RNA ribossômico, indicando a possível herança a partir de um ancestral comum e herança dos genes que conferem habilidade de fixar nitrogênio pelo processo de reprodução. A aquisição dos genes responsáveis pela fixação pela transferência de material genético entre espécies não relacionadas (transferência horizontal), se existir, é rara (Giller & Wilson, 1993).

### 3. A FBN é um Processo Regulado

Os organismos fixadores de nitrogênio regulam a intensidade com que a fixação ocorre, pois, em primeiro lugar, como há um grande dispêndio de energia, não deve haver fixação se já existe nitrogênio combinado suficiente. Amônio é o composto nitrogenado mais estudado quanto à capacidade de inibir a FBN, mas também pode ser inibida por ácidos aminados e nitrato (Rudnick et al., 1997). Em segundo lugar, a nitrogenase é extremamente sensível à presença de  $O_2$ . Esses dois fatos levaram os organismos aeróbios fixadores de nitrogênio a desenvolverem várias estratégias de proteção da enzima ao oxigênio.

Assim, a transcrição (síntese de RNA mensageiro) dos genes relacionados à FBN, chamados genes *nif*<sup>1</sup>, só ocorre em condições de baixos  $O_2$  e nitrogênio fixado, o que se chama regulação gênica ao nível de transcrição.<sup>2</sup> Pode ocorrer também regulação gênica pós- traducional (enzimas já codificadas podem ser ativadas e inativadas).



Fator  $\sigma$  (lê-se sigma) é a subunidade da RNA polimerase responsável pelo reconhecimento do promotor. Em procariotos, embora a RNA polimerase seja de um único tipo, são diversos os fatores sigma, cada um expresso em uma condição ambiental e cada qual reconhecendo seqüências promotoras específicas. Esses diferentes fatores sigma consistem em uma estratégia para regulação de grupos de operons em situações ambientais distintas. O fator  $\sigma^N$  também chamado de fator  $\sigma^{54}$ , como referência a seu peso molecular, é ativado quando a concentração de amônia no meio é baixa e são necessárias fontes alternativas de nitrogênio (Lewin, 1997).

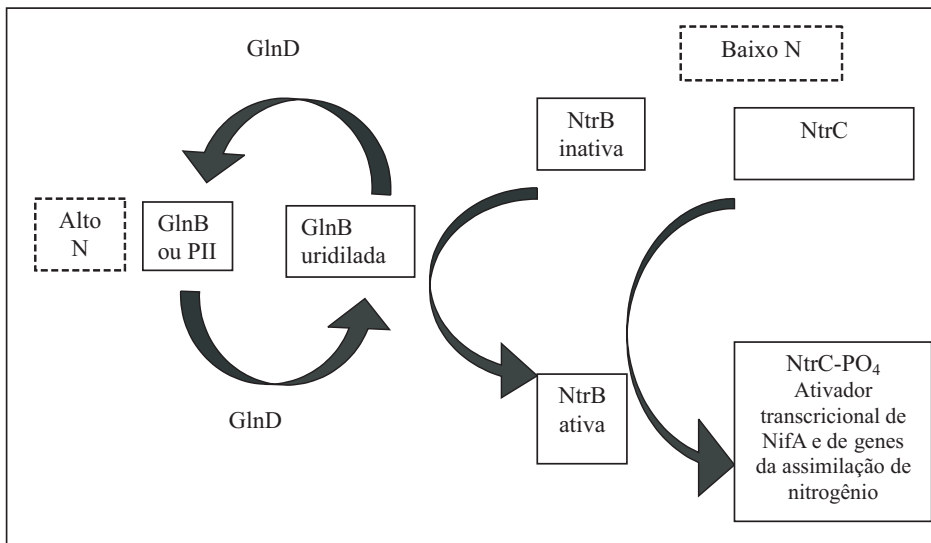
NifA é um ativador de transcrição que liga-se a seqüências promotoras de operons *nif* e interage com a RNA polimerase, iniciando a transcrição. Junto com  $\sigma^N$ , permite que a transcrição ocorra. O domínio C-terminal de NifA é responsável pela interação com  $\sigma^N$  e com a RNA polimerase. A seqüência de aminoácidos dessa parte da proteína é bastante semelhante entre as já seqüenciadas em diferentes organismos (seqüência de aminoácidos conservada). O domínio central, também conservado, é responsável pela interação com o DNA (Monteiro et al., 1999). O ativador de transcrição NifA mostrou-se necessário para a expressão dos genes *nif* em todas as proteobactérias até hoje estudadas (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Entretanto, a região regulatória de NifA e, conseqüentemente, a maneira como é regulada, varia nos diferentes organismos.

A nitrogenase mais estudada é composta por duas metaloproteínas. A responsável pela redução do substrato, nitrogenase redutase, codificada pelos genes *nifDK*, contém ferro e molibdênio. A responsável pela ligação ao ATP e doadora de elétrons, codificada pelo gene *nifH*, contém ferro. Outros sistemas de enzimas podem existir, nos quais, aparentemente, o molibdênio é substituído por vanádio ou ferro (Rees & Howard, 2000).

Outros genes *nif* foram estudados e o fixador de vida livre onde são mais conhecidos é *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria também presente na flora normal em seres humanos, que pode eventualmente causar pneumonia ou infecções hospitalares (Trabulsi et al., 1999). Pelo seqüenciamento de RNA ribossômico, essa bactéria foi classificada dentro do subgrupo  $\alpha$  (gama) de proteobactérias. Nela são conhecidos genes *nif* que codificam enzimas responsáveis pela transferência de elétrons à nitrogenase (*nifF*, *nifJ*), biossíntese dos cofatores contendo FeMo (*nifQB*, *nifEN*, *nifV*), inserção de agrupamentos de Fe-S na nitrogenase (*nifSU*) e processos não bem definidos de conversão da nitrogenase inativa a ativa (*nifM*, *nifW*) (Rudnick et al., 1997). Homólogos desses genes são encontrados em outras espécies fixadoras. Genes diretamente envolvidos na FBN são bastante conservados.

A regulação da FBN depende também dos genes do sistema global de regulação de nitrogênio (genes *ntr*) e de genes relacionados à assimilação do nitrogênio fixado. Um gene bastante estudado é *glnA*, que codifica a sintetase de glutamina (GS). Essa enzima é a responsável pelo primeiro passo para a assimilação do nitrogênio fixado, pois adiciona amônia a glutamato, que possui um átomo de nitrogênio, transformando-o em glutamina, que possui dois átomos de nitrogênio.

GlnD é a primeira sensora de N na célula. Ela adiciona, quando há alta concentração de N, ou retira, quando há pouco N, uridil monofosfato de GlnB (uma proteína da família P<sub>II</sub>, que participa de transdução de sinais) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Quando uridilada, GlnB estimula a atividade quinase de NtrB, que então fosforila NtrC. NtrC-PO<sub>4</sub>, em *K. pneumoniae*, é ativador transcricional de NifA, bem como de genes relacionados a assimilação de N, inclusive de *glnA*, que codifica a sintetase de glutamina (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema sensor da quantidade de nitrogênio combinado existente na célula, em *Klebsiella pneumoniae*. (Baseado em Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Existem dois tipos de mutantes de *K. pneumoniae* para P<sub>II</sub>. Num primeiro tipo, onde um único aminoácido foi alterado de forma que a proteína não pode ser uridilada, os genes *nif* não são codificados. Em mutantes onde a proteína foi totalmente alterada pela inserção de um transposon, a expressão dos genes *nif* é constitutiva, mesmo em altas concentrações de amônio (Rudnik et al., 1997).

Como outros organismos diazotróficos regulam a FBN conforme a disponibilidade de N fixado e concentração de O<sub>2</sub> no meio? Será que as mesmas proteínas controlam também a expressão de *nifA* nesses organismos? Diversos organismos respondem diferentemente a essas perguntas. Organismos para os quais a pesquisa brasileira contribuiu significativamente para o entendimento da regulação da FBN são *Herbaspirillum seropedicae*; *Azospirillum brasiliense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

<sup>2</sup> Note que o nome de genes se escreve em itálico e em minúscula, enquanto que as proteínas codificadas por eles, com a primeira letra maiúscula. Por exemplo, NifA é produto do gene *nifA*.

## **Herbaspirillum seropedicae**

*Herbaspirillum seropedicae* não sobrevive bem em solo, principalmente quando presentes outros microrganismos, mas é encontrado em raízes, caules e folhas de gramíneas, sendo então considerado endofítico obrigatório (Baldani et al., 1997). É classificado como bactéria da subclasse  $\beta$  das proteobactérias.

Como em outras bactérias diazotróficas, *H. seropedicae* possui um gene *nifA*, cuja expressão é ativada pelo fator  $\sigma^N$ , que atua como ativador transcricional de outros genes *nif* (Souza et al., 1991 a,b).

Tanto amônio como oxigênio regulam a expressão de NifA em *H. seropedicae* (Souza et al., 1999). O promotor funcional de *nifA* é ativado por NtrC (Souza et al., 2000). Na região promotora existe também sítio de ligação para NifA, que, portanto, é auto-regulada (Monteiro et al., 2003a), e é a regulação conjunta por NtrC, NifA e fator IHF (*integration host factor*) que promove o ajuste fino da expressão de *nifA* (Wassem et al., 2002).

O domínio N terminal de NifA é responsável pela repressão da FBN em situações em que a concentração de nitrogênio fixado, na forma de amônio, é elevada (Monteiro et al., 1999a,b; Souza et al., 1999), o que aparentemente é mediado pela proteína Fnr (Monteiro et al., 2003b).

Dois genes homólogos a *glnB*, que codifica  $P_{II}$ , foram isolados. A seqüência de aminoácidos codificada de um deles tinha 73% de homologia com a proteína de *K. pneumoniae*. Mutantes desse gene foram incapazes de fixar nitrogênio, mostrando que também em *H. seropedicae* a regulação de *nifA* depende de  $P_{II}$  (Benelli et al., 1997, 2001). A estrutura cristalográfica de  $P_{II}$  foi estudada por difração de raios X (Benelli et al., 2002) e constatou-se que a região C terminal e alça T afetam a expressão de NifA (Bonatto et al., 2005).

A atividade da sintetase de glutamina (enzima responsável pelo primeiro passo para a assimilação do nitrogênio fixado), codificada por *glnA*, foi igual em mutantes para *glnB* e na da cepa selvagem (Benelli et al., 1997). Existe controle ao nível de transcrição e pós-traducional da sintetase de glutamina em *H. seropedicae*, dependente das proteínas NtrC e NtrB (Persuhn et al., 2000). Pela purificação de NtrC, foi possível comprovar que essa proteína liga-se à região promotora de *glnA*, participando, portanto, de sua regulação (Twerdochlib et al., 2003).

O seqüenciamento completo de *H. seropedica* está sendo finalizado pelo Genopar (<http://www.genopar.org>).

## **Azospirillum**

As cinco espécies de *Azospirillum* descritas até hoje são fixadoras de nitrogênio: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* e *A. irakense*. São RPCPs e pertencem ao subgrupo  $\alpha$  (alfa) de proteobactérias, o mesmo que rizóbios. A quantidade de nitrogênio fixado por essas bactérias é relativamente pequena, portanto outros fatores devem estar envolvidos na sua contribuição para o crescimento das plantas, entre eles a síntese de hormônios vegetais pela bactéria (Rudnick et al., 1997). São endofíticos facultativos e só fixam nitrogênio em microaerobiose (Emelrich et al., 1997).

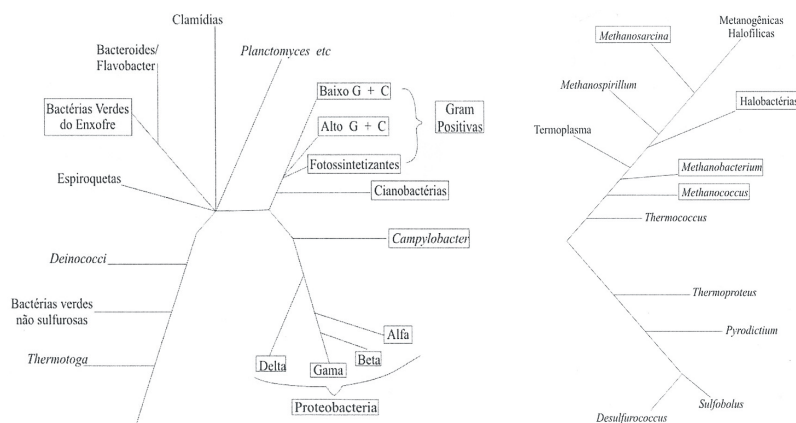
O operon que codifica NtrB e NtrC foi identificado em *A. brasilense*. Mutantes *ntrB*<sup>-</sup> e *ntrC*<sup>-</sup> têm atividade de nitrogenase, embora reduzida, sugerindo que *ntrB* e *ntrC* não são essenciais para a síntese da enzima (Machado et al., 1995).

Como é regulada a expressão de *nifA* em *A. brasilense*? O gene não é controlado pela própria proteína NifA, nem por NtrC e nem por  $\sigma^N$ . Portanto, difere de *K. pneumoniae* (Figura 1). Por meio de análise de deleção, identificou-se a região promotora de *NifA*, que responde negativamente tanto à presença de amônio como de oxigênio. A repressão da expressão de *NifA* envolveu efeito sinérgico entre as concentrações de oxigênio e amônio (Fadel-Picheth et al., 1999).

Outros genes relacionados à regulação da FBN ainda devem ser encontrados. Mutantes em uma seqüência de DNA identificada por Revers et al. (2000) têm quatro vezes maior habilidade de fixar nitrogênio que a cepa selvagem. Ao mesmo tempo, os mutantes não crescem bem na presença de glutamato ou asparagina. Como a FBN e a assimilação de nitrogênio têm mostrado mecanismos regulatórios comuns, o efeito pleiotrópico torna o produto dessa seqüência de DNA um candidato à proteína regulatória. Ainda, essa seqüência não tem homologia com outros genes de bactérias diazotróficas, mas sua porção C-terminal tem homologia com proteínas regulatórias ativas em situações de estresse.

Tanto em *H. seropedicae* como em *A. brasilense*, existe, além de GlnB, uma outra proteína da família P<sub>II</sub>, chamada GlnZ que, embora com alta homologia com GlnB, tem funções diferentes. Em *A. brasilense*, GlnZ é regulada por uridilação e, como em *K. pneumoniae* (Figura 1), GlnB é essencial para a transcrição de *NifA* (Araújo et al., 2004), sendo reguladora primária da concentração intracelular de NtrC-P. A proteína GlnZ não a substitui (Araújo et al., 2004), embora possa estimular a fosforilação de NtrC em um mutante *glnB*<sup>-</sup> (Inaba, 2005).

Em *Azospirillum* existe controle pós-traducional da nitrogenase: em condições de alta concentração de nitrogênio combinado ou de oxigênio, as enzimas DraT e DraG ligam ADP-ribose à nitrogenase, inativando-a. Esse processo é reversível (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).



**Figura 1.** Bactérias fixadoras de nitrogênio estão presentes nos grupos cujos nomes estão em retângulos. As distâncias filogenéticas não correspondem em escala à figura. (Extraído de Giller & Wilson, 1993).

### **Gluconacetobacter diazotrophicus**

A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada de cana de açúcar e inicialmente denominada *Acetobacter diazotrophicus*. Seu genoma está sendo inteiramente seqüenciado pelo projeto RIOGEN (<http://www.riogene.lncc.br>).

Uma abordagem que tem sido freqüentemente usada pelos projetos que envolvem genoma é o seqüenciamento de ESTs, do inglês, *expressed sequence tags*. Nesses, ao invés do seqüenciamento do DNA genômico como um todo, apenas as seqüências expressas são analisadas. Como grande parte dos genes é regulada, resultando em expressão em apenas determinados processos de desenvolvimento, tecidos ou situações ambientais, podem-se comparar genes expressos em diferentes situações. Compararam-se, assim, genes expressos por plantas de cana de açúcar colonizadas ou não por *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Os genes expressos exclusivamente nas plantas colonizadas são possivelmente genes envolvidos na sinalização e interação entre a bactéria e a cana de açúcar, possibilitando o estabelecimento da relação endofítica (Vargas et al., 2003). Como é esperado que a bactéria também tenha genes responsáveis pela interação com o hospedeiro e, com o objetivo principal de identificá-los, está sendo realizado o projeto "Análise de proteoma da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* e de sua interação endofítica com plantas de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*)", como parte da Rede Proteômica do Rio de Janeiro (PROTEOMA-RIO, <http://www.bioinfo.ufrj.br/proteoma>).

## **4. Moléculas-sinais Estabelecem Simbioses Mutualísticas**

Espécies de bactérias diazotróficas podem associar-se a plantas superiores, pteridófitas ou fungos, desenvolvendo simbioses mutualísticas. Esses hospedeiros têm maior facilidade de captação de energia, fornecendo-a ao microssimbionte, que em troca lhes fornece nitrogênio fixado.

Nesses sistemas existem trocas de sinais que possibilitam reconhecimento entre as espécies envolvidas, bem como expressão de genes que se fazem necessários para as alterações fisiológicas e morfológicas que possibilitam a simbiose.

A simbiose mais estudada e de maior relevância para a agricultura é a que ocorre entre rizóbios e plantas da família Fabaceae (leguminosas). O termo rizóbio agrupa bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*. Na interação entre rizóbios e leguminosas formam-se estruturas radiculares chamadas nódulos, onde ocorre a fixação de nitrogênio.

Será que com técnicas de biotecnologia, como clonagem e transformação genética de plantas, seria possível estabelecer a associação com rizóbios em outras plantas, não leguminosas? A resposta a essa questão envolve o entendimento de como se dá o reconhecimento entre as espécies e o conhecimento dos genes de cada espécie que possibilitam a interação.

Macro e microssimbiontes possuem genes relacionados à simbiose mutualística. Incluem os genes da planta, que podem ser de expressão constitutiva, como da via biossintética de sinais celulares e receptores, e também genes da planta induzidos durante a interação, que codificam proteínas chamadas nodulinas. Uma proteína com características de fator de transcrição, essencial para a formação do cordão de infecção, foi identificada, sendo que sua expressão foi maior nas células primordiais dos nódulos e em algumas células dos nódulos maduros (Schauser et al., 1999). Os genes dos rizóbios incluem tanto aqueles também presentes em fixadores de vida livre, como genes exclusivos dos rizóbios, os genes *nod*.

Os sinais que mediam a interação de plantas com rizóbios são conhecidos: a planta exsuda flavonóides que, percebidos pelo rizóbio, induzem-no a ativar os genes *nod*, sendo que vários codificam enzimas responsáveis pela biossíntese dos fatores Nod, que são lipo-oligossacarídeos. Estes lipo-oligossacarídeos são sinais para as plantas, que, na sua presença, ativam genes que codificam proteínas responsáveis pelo processo de nodulação (Long, 1996).

Existe especificidade entre hospedeiro e microssimbionte na interação entre rizóbio e leguminosa, que pode ser explicada por dois modelos. No primeiro, a especificidade deve-se ao reconhecimento ou não dos exsudatos da planta pela bactéria, que induz ou não os genes *nod*. Esse modelo foi verificado nas interações entre *Lotus* e *Rhizobium loti* e *Phaseolus* e *R. etli*. *Lotus* pode ser colonizado por *R. loti* mas não por *R. etli* mas, uma vez induzida a expressão constitutiva de genes *nod* em *R. etli*, a colonização ocorre. No segundo modelo, a especificidade deve-se aos lipo-oligossacarídeos. Por exemplo, alfafa induz a expressão de genes *nod* tanto em *R. meliloti* como em *R. leguminosarum* bv. *viceae*. Portanto, ambos sintetizam lipo-oligossacarídeos. No entanto, os lipo-oligossacarídeos sintetizados por *R. leguminosarum* bv. *viceae* não induzem nodulação, mas apenas aqueles sintetizados por *R. meliloti* (Long, 1996).

Entretanto, em algumas interações a especificidade entre rizóbio e hospedeiro pode ser bem menor como, por exemplo, a cepa NGR234 de *Rhizobium nodula* 232 diferentes espécies de plantas leguminosas, além de uma espécie não leguminosa também hospedeira de rizóbios, *Parasponia andersonii* (Pueppke & Broughton, 1999).

As respostas da planta aos fatores Nod incluem fluxo de íons através da membrana plasmática e sua despolarização e alterações na concentração intracelular de cálcio. Ocorre encurvamento do pêlo radicular. A bactéria penetra através do cordão de infecção. Quando chega nas células hipodérmicas, ocorre divisão acelerada dessas células (hiperplasia) e também crescimento (hipertrofia). A bactéria diferencia-se em bacteróide. Assim são formados os nódulos (Hirsch et al., 2001; Pawlowski & Bisseling, 1996).

A proteção contra o O<sub>2</sub> ocorre pela nodulina leg-hemoglobina, uma proteína com alta afinidade pelo oxigênio, capaz de liberá-lo para o bacteróide em baixas concentrações, suficientes para a respiração mas nunca prejudiciais à nitrogenase .

Assim, a interação de rizóbio e leguminosas envolve um conjunto grande de genes e, visto pela perspectiva atual de transformação de plantas, pela qual usualmente a característica transferida é monogênica, parece ser necessário caminhar mais, tanto no conhecimento da interação quanto na proposta da biotecnologia.

No entanto, a maioria dos genes ativados deve estar presente também em plantas não leguminosas. Curiosamente, alguns mutantes para não nodulação de ervilha e alfafa são resistentes também à colonização por fungos micorrízicos arbusculares, que tem um amplo espectro de hospedeiros (80% das espécies cultivadas), mostrando que mecanismos genéticos comuns controlam passos nas duas diferentes simbioses (Duc et al., 1989). Especula-se que a interação de rizóbios com leguminosas possa ter evoluído a partir das micorrizas arbusculares.

*Frankia* são bactérias Gram-positivas, filamentosas, antes classificadas como actinomicetos. Associam-se a plantas de oito diferentes famílias de dicotiledôneas, chamadas actinorrízicas, numa associação simbiótica, com formação de nódulos, portanto aparentemente relacionada à associação entre rizóbios e leguminosas. Entretanto, há diferenças grandes quanto à estrutura e ontogenia. Leguminosas e plantas actinorrízicas parecem ter origem evolutiva comum, sugerindo que genes relacionados às simbioses seriam preferencialmente encontrados nessas famílias (Pawlowski & Bisseling, 1996).

Mesmo tendo uma interação menos complexa que as simbióticas, as bactérias diazotróficas que se associam a raízes ou partes superiores de plantas também devem ter mecanismos, ainda não identificados, de estabelecer e desenvolver a interação. O indício da existência de troca de sinais é a especificidade observada entre bactéria e planta hospedeira (Baldani et al., 1997).

Segundo Mathesius (2003), os organismos microsimbiontes podem ter evoluído através do aproveitamento de sinais pré-existentes na planta, o que não exige da planta ser capaz de interpretar diferentes línguas, seriam os simbiontes os capazes de falar uma versão “esperanto” da sinalização molecular.

Assim, nota-se que a fixação biológica de nitrogênio envolve tanto o sistema global de regulação de nitrogênio na célula como também a regulação dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio, estes exclusivos dos procariotos fixadores. Embora estes genes sejam conservados, seus mecanismos de regulação diferem entre os organismos já estudados, sendo, em grande proporção, ainda desconhecidos.

## Referências

- ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 491–495, 2004.
- ARAÚJO, M. S.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Expression and Purification**, v. 33, p. 19–24, 2004.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p 549-79, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent Advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 911-22, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F.O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 309-314, 2001.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n.14, p. 4623-6, 1997.

BENELLI E.M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, L.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F.O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3296-3303, 2002.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; BENELLI, E. M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signaling. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 634-640, 2005.

DUC, G.; TROUVELOT, A.; GIANINNAZZI-PEARSON, V.; GIANINNAZZI, S. First reports of non mycorrhizal plant mutants (*myc*<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and Fababean (*Vicia faba* L.) **Plant Science**, v. 60, p. 215-22, 1989.

EMELRICH, C.; ZAMAROCZY, M.; ARSÈNE, F.; PEREG, L; PASQUELIN, A.; KAMINSKI, A. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 847-852, 1997.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasiliense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281-8, 1999.

GENOPAR. Disponível em <http://www.genopar.org> . Acesso em março de 2007.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Wallingford: CAB International, 1993. 313 pp.

HIRSH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? **Plant Physiology**, v.127, p. 1484-1492, 2001.

INABA, J. Efeito de mutações nas proteínas GlnB e GlnZ sobre a regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 112p. (Dissertação de Mestrado).

LEWIN, B. Transcription. In: **Genes VI**. New York: Oxford University Press, 1997. Cap. 11, p. 287.

LONG, S. R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **The Plant Cell**, v. 8, n.10, 1996.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFESN, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The *NtrBC* genes of *Azospirillum brasiliense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 674-84, 1995.



- MATHESIUS, U. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. **Plant and Soil**, v. 255, p. 105–119, 2003.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v.447, p. 283-6, 1999a.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In-trans regulation of the N-truncated-NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p. 157-61, 1999b.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1527-1531, 2003.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; STEFFENS M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression, purification and functional expression of C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expression and Purification**, v.27, p. 313-318, 2003.
- PAWLOWSKI, K., BISSELING, T. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are shared features? **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, 1899-913, 1996.
- PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS-Microbiology-Letters**. v. 192, n. 2, p. 217-221, 2000.
- PROTEOMA-RIO. Disponível em <http://www.bioinfo.ufrj.br/proteoma>. Acesso em março de 2007.
- PUEPKKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 12, p. 293-318, 1999.
- REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 559-66, 2000.
- REVERS, L. F.; PASSAGLIA, L. M. P.; MARCHAL, K.; FRAZZON, J.; BLAHA, C. G.; VANDERLEYDEN, J.; SCHRANK, I. S. Characterization of an *Azospirillum brasilense* Tn5 mutant with enhanced N<sub>2</sub> fixation: The effect of ORF280 on nifH expression. **FEMS-Microbiology-Letters**, v.183, n.1, p. 23-29, 2000.
- RIOGEN. Disponível em <http://www.riogene.lncc.br>. Acesso em março de 2007.
- RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 831-41, 1997.
- SCHAUSER, L.; ROUSSIS, A.; STILLER, J.; STOUGAARD, J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. **Nature**, v. 402, p.191-195, 1999.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS-Microbiology-Reviews**: v. 24, n.4, p 487-506, 2000.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB* like gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p.1511-22, 1991b.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p.681-4, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 1999. 586pp.

TWERDOCHLIB, A.L.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 30, p. 117–123, 2003.

VARGAS, C; PADUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E.D.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P.; SILVA, F. R.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, p. 159-180, 2003.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae* *nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p.177-182, 2002 .

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

# Capítulo 10

## Diversidade e Taxonomia de Rizóbio

Rosana Faria **VIEIRA** <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

Rizóbios são bactérias do solo que possuem habilidade para induzir a formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos no caule, de plantas leguminosas, onde convertem o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta hospedeira. A família Leguminosae compreende cerca de 650 gêneros e 18000 espécies distribuídas mundialmente nas mais diferentes condições ecológicas. Entretanto, poucas espécies têm sido estudadas com relação ao seu potencial em formar simbiose com rizóbio, visando a fixação do N<sub>2</sub> atmosférico.

Com o advento e aplicação de novas técnicas moleculares e em decorrência da importância econômica e ecológica dos rizóbios, extensivos estudos foram realizados nas últimas décadas com essas bactérias. Como resultado, novas estirpes têm sido descobertas e novos gêneros e espécies estão sendo criados, causando profundas mudanças na taxonomia desses microrganismos. Neste capítulo pretende-se ilustrar o histórico da taxonomia dos rizóbios e a ampla diversidade destas bactérias nos mais diferentes tipos de solo e planta.

### 2. Histórico da Taxonomia de Rizóbios

No século XIX, os estudos clássicos de Hellriegel e Wilfarth (1888) foram os primeiros a estabelecer que eram os micróbios nos nódulos das raízes que permitiam às leguminosas obter o nitrogênio do ar. Esses microrganismos foram isolados ainda em 1888 por Beijerinck, que os nomeou de *Bacillus radicola*. Posteriormente, foram denominados *Rhizobium leguminosarum* por Frank (1889). Inicialmente, os pesquisadores consideraram o rizóbio como espécie única, capaz de nodular todas as leguminosas. Löhnis e Hansen (1921) sugeriram a divisão do rizóbio em dois grupos de acordo com a taxa de crescimento em meio de cultura.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisas em Meio Ambiente, Caixa Postal- 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP. Email: rosana@cnpma.embrapa.br

O termo rizóbio de crescimento rápido passou a referir-se às bactérias associadas com alfafa, trevo, feijão e ervilha. As bactérias de crescimento lento foram exemplificadas pelas bactérias de soja e caupi. Fred et al. (1932) basearam-se nos hospedeiros e em algumas diferenças morfológicas e fisiológicas para o reconhecimento de seis espécies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* e *R. lupini*. Nenhuma mudança nessa nomenclatura foi feita até 1982.

Por muitas décadas, a caracterização de espécies de rizóbio foi baseada na habilidade específica da bactéria em nodular a planta hospedeira. Estudos iniciais mostraram que cada estirpe ou isolado de rizóbio tinha um determinado grupo de hospedeiros, ou seja, nodulava certas leguminosas, mas não outras. Isso levou ao conceito de inoculação cruzada, com as leguminosas sendo agrupadas de acordo com o rizóbio com o qual elas formavam nódulos. Mais de 20 grupos de inoculação cruzada foram identificados, com as bactérias do grupo do trevo, alfafa, feijão, tremoço, ervilha e soja sendo denominadas como espécies separadas de um único gênero, *Rhizobium* (ex: *R. trifolii* para trevo).

Embora a especificidade ainda seja um ponto importante na identificação do rizóbio, recentemente, outras características têm assumido maior importância na sua classificação, por diferentes razões. Os estudos iniciais envolveram, principalmente, leguminosas de importância agrícola; estudos com leguminosas menos tradicionais tornaram obscuros os limites da inoculação cruzada. A estirpe bacteriana NGR234, por exemplo, originalmente isolada de *Lablab purpureus*, o feijão-lablabe, nodula com 34 diferentes espécies de leguminosas e com uma espécie não-leguminosa (*Parasponia andersonii*) (Stanley e Cervantes, 1991). Além disso, os genes da nodulação de alguns rizóbios estão no plasmídeo. A perda desse plasmídeo por algumas estirpes, em decorrência da exposição a altas temperaturas, faz com que a bactéria perca sua habilidade para formar nódulos e, portanto, não possa ser identificada. No solo, rizóbios não infectivos, sem o plasmídeo simbiótico, excedem em número aqueles capazes de formar nódulo, na proporção de 40 para 1 (Graham, 1998). Os novos métodos taxonômicos desenvolvidos para comparar estirpes, com base em diferentes características, resultaram em agrupamentos cada vez mais distantes daqueles baseados na capacidade específica da bactéria para nodular a planta hospedeira.

Reconhecendo-se as limitações da infecção da planta como o maior determinante taxonômico, outros caminhos começaram a ser trilhados para melhor catalogar os rizóbios. A taxonomia numérica reforçou as diferenças entre os grupos de rizóbio de crescimento rápido e lento (Tabela 1) e levou à consolidação de algumas espécies dentro de cada grupo. Em 1984, dois gêneros foram descritos, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Três espécies foram nomeadas para o gênero *Rhizobium*: *R. loti*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum* com três biovars, *viceae*, *phaseoli* e *trifolii*. O gênero *Bradyrhizobium* ("bradus", grego, significando lento) compreendeu todas as estirpes de crescimento lento e somente uma espécie foi nomeada: *B. japonicum*, o microssimbionte de soja. Todas as outras estirpes de crescimento lento foram descritas como *Bradyrhizobium* spp., ou seja, o chamado grupo caupi ou bradirrizóbios tropicais.

Hennecke et al. (1985) analisaram o gene *16S rRNA* dos rizóbios de crescimento rápido e lento e concluíram que esses dois grupos apresentavam, de fato, diferenças

filogenéticas, uma vez que o coeficiente de similaridade do RNA era somente 0,53. Jarvis et al. (1986) estudaram a relação intergenérica entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e também confirmaram a disparidade filogenética entre esses dois grupos. Ademais, eles notaram separações distintas de grupos dentro desses gêneros, predizendo a necessidade de reclassificar e reorganizar o esquema até então utilizado.

**Tabela 1.** Sumário das diferenças entre rizóbios de rápido e lento crescimento.

Características	Crescimento rápido	Crescimento lento
Tempo de geração	< 6 h	> 6 h
Utilização de carboidratos	Pentoses, hexoses e mono-, di-, e trissacarídeos	Pentoses e hexoses
Vias metabólicas <sup>(1)</sup>	EMP baixa atividade Específica da estirpe ED via principal TCA completamente ativo PP	EMP baixa atividade ED via principal TCA completamente ativo Ciclo da hexose
Flagelos	Peritríquios	Subpolar
Localização do gene simbiótico	Plasmídeo e cromossomo	Cromossomo
Localização do gene de fixação do nitrogênio	nifH, nifD, nifK no mesmo operon	NifD, nifK, e nif H em operons separados
Resistência intrínseca a antibióticos	Baixa	Alta

<sup>(1)</sup> ED, via Entner-Doudoroff; EMP, via Embden-Meyerhof-Parnas; PP, via Fosfato Pentose; TCA, Ciclo do Ácido Tricarboxílico. (Elkan, 1992)

### 3. Taxonomia Recente de Rizóbios

Apesar da grande diversidade de plantas leguminosas hospedeiras disponíveis para os microssimbiontes, somente dois gêneros de rizóbio (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) e quatro espécies eram descritas na primeira edição do manual de Bergey. O notável progresso na taxonomia rizobiana levou à descrição de mais de 40 novas espécies e de quatro gêneros adicionais, ou seja, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. O gênero *Allorhizobium*, inicialmente proposto por Lajudie et al. (1998b) com uma única espécie, *A. undicola*, foi posteriormente incorporado ao gênero *Rhizobium* (Young et al., 2001).

Os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, que tradicionalmente tinham sido incluídos na família *Rhizobiaceae*, passaram a pertencer às novas famílias *Azorhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Phyllobacteriaceae*, respectivamente (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). A família *Rhizobiaceae* compreende os gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e é genotipicamente relacionada à família *Phyllobacteriaceae*. As famílias *Azorhizobiaceae* e *Bradyrhizobiaceae* são muito próximas filogeneticamente, mas estão distantes das demais famílias.

Embora todos os gêneros de rizóbio pertençam à subclasse Alphaproteobacteria, recentemente, bactérias pertencentes à subclasse Betaproteobacteria têm sido identificadas em nódulos de leguminosas. Isolados bacterianos obtidos de nódulos de *Aspalathus carnosus* e *Machaerium lunatum* foram identificados como *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) e *Ralstonia taiwanensis* e *Ralstonia eutropha* foram identificados em nódulos de *Mimosa*, na China (Chen et al., 2001) e na Índia (Tripathi, 2002), respectivamente.

### Gênero *Rhizobium*

Dentro do grupo que foi classificado como *Rhizobium*, três gêneros são agora reconhecidos: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al. 1997).

A taxonomia de rizóbios que nodulam *Phaseolus vulgaris* foi a que passou por maiores alterações taxonômicas, nos últimos anos, desde a descrição de *Rhizobium phaseoli*, baseada unicamente na habilidade da bactéria em nodular seu hospedeiro. Com o surgimento de técnicas moleculares adequadas, tornou-se evidente a grande diversidade de estirpes capazes de nodular essa leguminosa. Atualmente, elas são classificadas em cinco espécies. *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* foi primeiro dividido em tipos I e II (Martínez et al., 1988). *Rhizobium tropici* tipos A e B foram propostos para as estirpes do tipo II, carregando uma única cópia do gene *nifH*.

Os tipos A e B diferem entre si pelos valores de hibridização DNA-DNA, por características fenotípicas e pela presença de megaplasmídeos específicos (Martínez-Romero et al., 1991; Geniaux et al., 1995). *R. etli* foi então proposto para as estirpes *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tipo I (Segovia et al. 1993). Elas possuem cópias múltiplas do gene estrutural da nitrogenase em seus plasmídeos simbióticos. Trabalhos posteriores realizados com isolados obtidos de nódulos de raízes de *Mimosa affinis* levaram à proposição de um novo biovar, bv. *mimosae*, dentro da espécie *R. etli* (Wang et al., 1999a). Embora ambos os biovars, *phaseoli* e *mimosae*, possam nodular *P. vulgaris*, somente o biovar *mimosae* pode formar nódulos fixadores de nitrogênio em *Leucaena leucocephala*.

Duas espécies adicionais de rizóbio capazes de estabelecer simbiose com o feijoeiro foram caracterizadas na França. Os nomes propostos foram *R. gallicum* e *R. giardinii* (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1997). Essas espécies foram subdivididas em dois biovars; *R. gallicum* bv. *phaseoli* e *R. giardinii* bv. *phaseoli* mostraram a mesma variação relativa ao hospedeiro do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, o mesmo número de cópias do gene *nifH* e homologia em termos do gene *nodB* de *R. etli*. *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. giardinii* bv. *giardini* nodulam *L. leucocephala* e não são homólogos ao *R. etli* com relação ao gene *nodB*, como o são com *R. tropici*. Eles possuem cópias únicas do gene *nifH* e não foi detectada homologia em relação aos genes estruturais *nifK*, *D* e *H*, que são altamente conservados entre os fixadores de N<sub>2</sub>.

Lindström (1989), por meio de estudos com bactérias que nodulam as espécies *Galega orientalis* e *Galega officinalis*, mostrou que o rizóbio de crescimento rápido

encontrado nessas espécies não era claramente relacionado às espécies de rizóbio até então conhecidas. Uma nova espécie de rizóbio foi então proposta e denominada *Rhizobium galegae*. Estirpes dessa espécie de rizóbio são, porém, muito específicas quanto às plantas hospedeiras e à fixação de nitrogênio. Radeva et al. (2001) mostraram características genéticas diferentes relacionadas à simbiose em *R. galegae* e propuseram as denominações de *R. galega* bv. *orientalis* e *R. galega* bv. *officinalis* para as estirpes que formam simbiose eficiente com *G. orientalis* e *G. officinalis*, respectivamente. Uma nova espécie de *Rhizobium* isolada de *Sesbania herbacea*, no México, foi filogeneticamente relacionada ao *R. galegae* e nomeada *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1998).

### Mais recentemente outras espécies de *Rhizobium* foram propostas:

➤ Tan et al. (2001) propuseram o nome de *R. yanglingense* à espécie nova de rizóbio obtida de leguminosas selvagens, em regiões áridas e semi-áridas no noroeste da China. Esta espécie não forma nódulos em *Galega orientalis* e *Leucaena leucocephala*, enquanto que em *Phaseolus vulgaris* os nódulos formados são ineficientes.

➤ Wei et al. (2002), utilizando uma abordagem polifásica, caracterizaram estirpes de rizóbio isoladas de *Indigofera* e propuseram uma nova espécie que foi nomeada *Rhizobium indigoferae*.

➤ Squartini et al. (2002) descreveram e propuseram o nome de *Rhizobium sullae* (inicialmente denominado *Rhizobium hedysari*) ao microssimbionte isolado de *Hedysarum coronarium* L..

➤ Wei et al. (2003) isolaram rizóbios de leguminosas do gênero *Astragalus* e propuseram uma nova espécie: *Rhizobium loessense* (inicialmente denominado *Rhizobium huanglingense*). Estirpes dessa espécie foram isoladas de *A. scobwerimus*, *A. complanatus* e *A. chrysopterus* e foram capazes de nodular *A. adsurgens* sob condições de laboratório.

### Gênero *Bradyrhizobium*

As estirpes de *Bradyrhizobium*, que nodulam soja efetivamente, eram todas conhecidas como *B. japonicum* (Jordan, 1982). Na década de 1980 vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* e, como consequência, Kuykendall et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*. Esta espécie é mais competitiva e mostra alta resistência a alguns antibióticos, enquanto *B. japonicum* é mais eficiente e fixa mais N<sub>2</sub>. Outra espécie, com a taxa de crescimento excepcionalmente lenta, foi proposta e denominada *B. liaoningense* (Xu et al., 1995). Rizóbios isolados de nódulos de *Lеспеzeа* sp., proveniente da China, levaram à descrição de uma nova espécie que foi nomeada *B. yuanningense* (Yao et al., 2002); esta espécie não forma nódulos em soja. Existem muitas outras estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* que não nodulam soja; elas são simplesmente conhecidas como *Bradyrhizobium* sp., seguido pelo nome do gênero da leguminosa hospedeira entre parênteses (Young e Haukka, 1996), por exemplo, *Bradyrhizobium* sp. (*Acacia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene* sp.) e *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

Mais recentemente, Rivas et al. (2004) isolaram estirpes bacterianas endofíticas de crescimento lento de estruturas semelhantes a tumores em raízes de *Beta vulgaris*, no norte da Espanha. Estudos dessas bactérias, por meio de abordagens taxonômicas moleculares e fenotípicas, mostraram que elas representavam nova espécie de *Bradyrhizobium* filogeneticamente similar ao *B. japonicum*. A esses isolados foi proposto o nome de *Bradyrhizobium betae*.

O nome *B. canariense* foi proposto para designar estirpes de rizóbio isoladas de leguminosas arbustivas, nas ilhas Canárias. Essa espécie difere das outras cinco espécies de *Bradyrhizobium* em várias características genotípicas, fisiológicas e ecológicas (Vinueza et al., 2005). Estirpes de *B. canariense* são altamente tolerantes a acidez, nodulam diversas leguminosas nas tribos Genisteeae e Loteae, mas não espécies de *Glycine*.

### **Gênero *Sinorhizobium***

Este gênero foi originalmente proposto por Chen et al. (1988) para incluir *Rhizobium fredii* e a nova espécie *S. xinjiangense*; a primeira proposta foi rejeitada, porque as seqüências do gene 16S rRNA indicaram que *Rhizobium fredii* era filogeneticamente relacionado a *Rhizobium meliloti*. Após um período de controvérsia essas duas espécies foram consideradas como pertencentes ao novo gênero *Sinorhizobium*. Esse gênero inclui hoje, além das já citadas, as espécies *S. sahelense* e *S. teranga*, que foram descritas após realizações de pesquisas com rizóbios indígenas, de crescimento rápido, no Senegal, oeste da África (de Lajudie et al., 1994). Essas últimas espécies foram divididas em dois biovars *sesbaniae* e *acaciae*, que compreendem as estirpes que nodulam *Sesbania* e *Acacia* respectivamente (de Lajudie et al., 1994).

*Sinorhizobium arboris* e *S. kostiense* foram propostas como espécies novas por Nick et al. (1999) e *S. morelense* foi descrita para designar um grupo de bactérias isoladas de nódulos de raízes de *Leucaena leucocephala* (Wang et al., 2002a). Estirpes dessa última espécie são altamente resistentes a alguns antibióticos, tais como, carbenicilina, canamicina e eritromicina. Bactérias isoladas de nódulos de *Kummerowia stipulacea* levaram à identificação de uma nova espécie de rizóbio, que recebeu a denominação de *S. kummerowiae* (Wei et al., 2002).

*Sinorhizobium americanus*, *S. indiaense* e *S. abri* foram recentemente descritas como espécies novas, nodulando, respectivamente, *Acacia* spp., no México (Toledo et al. 2003), *Sesbania rostrata* e *Abrus precatorius*, na Índia (Ogasawara et al. 2003).

### **Gênero *Mesorhizobium***

*Rhizobium loti* e outras espécies de *Rhizobium* apresentavam diferenças nas similaridades das seqüências 16S rDNA, nas taxas de crescimento e nos perfis de ácidos graxos, que as descaracterizavam de outras espécies dos gêneros *Rhizobium* ou *Sinorhizobium* (Jarvis et al., 1996). Para estas espécies Jarvis et al. (1997) propuseram um gênero novo, *Mesorhizobium*, que na época incluiu as seguintes espécies: *M. loti*, *M. ciceri* (Nour et al., 1994), *M. huakuii* (Chen et al., 1991), *M. mediterraneum* (Nour



et al., 1995), *M. tianshanense* (Chen et al., 1995) e *M. plurifarum* (de Lajudie et al., 1998a). Posteriormente, Wang et al. (1999), após extensivos estudos com rizóbios isolados de *Amorpha fruticosa*, na China, descreveram e propuseram a espécie nova, *M. amorphae*. Essa espécie de rizóbio contém plasmídeo simbiótico de 930 kb, ao contrário da maioria das outras espécies de *Mesorhizobium*, que, com exceção do *M. huakuii* (Zou et al., 1997), carregam os genes simbióticos em seus cromossomos. Isolados obtidos de *Prosopis alba*, na Argentina, levaram à proposição da espécie *M. chacoense* (Velásquez et al., 2001).

Mais recentemente, outras duas espécies pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* foram descritas: *Mesorhizobium septentrionale* e *M. temperatum*. Essas espécies foram isoladas na região norte da China em plantas de *Astragalus adsurgens* (Gao et al., 2004).

### **Gênero *Azorhizobium***

Esse gênero foi descrito por Dreyfus et al. (1988). A única espécie nomeada no gênero é *A. caulidonans*, que nodula caule e raízes de *Sesbania rostrata*. As estirpes que nodulam o caule de *Sesbania* diferem dos rizóbios de crescimento rápido por terem um único flagelo lateral e por serem incapazes de utilizar muitos dos carboidratos comumente metabolizados pelos rizóbios. As tabelas 2 e 3 apresentam de forma resumida os gêneros de rizóbio e as espécies descritas até o momento.

## **4. Diversidade de rizóbios**

Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios e com o surgimento e aplicação de novas técnicas moleculares, esses microrganismos têm sido intensivamente estudados durante a última década. Entretanto, a nodulação somente tem sido avaliada numa pequena parte das leguminosas (8% num total de 18000 espécies conhecidas) (Sprent, 1995), enquanto que a maioria dos solos do mundo ainda não foi explorada para a presença ou não de rizóbios. Não existem dúvidas, portanto, sobre a ocorrência de grande diversidade dessas bactérias ainda por ser explorada, com possibilidades de surgimento de novas espécies no futuro. Os estudos publicados, até o momento, sobre diversidade e filogenia de rizóbios consideram mais os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, do que o gênero *Bradyrhizobium*. A tabela 4 mostra, em termos mundiais, os locais onde os diferentes gêneros de rizóbio têm sido encontrados.

Nos estudos sobre diversidade de rizóbio são utilizadas tanto as técnicas baseadas no fenótipo quanto aquelas baseadas no genótipo. As técnicas fenotípicas incluem sorologia, resistência intrínseca a antibióticos, conteúdo de plasmídeos, tipo de fago e eletroforese da proteína total da célula.

As técnicas sorológicas, embora amplamente utilizadas para a caracterização de rizóbios (Irisarri et al., 1996; Olsen et al., 1994), não fornecem informações sobre os isolados que não reagem com os anticorpos. A sorologia seria útil para a identificação de estirpes homólogas em co-inoculação ou em experimentos de competição em que ocorra co-reação com outras estirpes.

**Tabela 2.** Gêneros e espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que nodulam raízes de leguminosas. Gêneros em parênteses referem-se às leguminosas hospedeiras.

<b>Rhizobium (Rhizobiaceae)</b>	
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ( <i>Trifolium</i> ), bv. viciae ( <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> ), bv. phaseoli ( <i>Phaseolus</i> )	(Jordan, 1982)
<i>R. tropici</i> ( <i>Phaseolus</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> )	(Martinez et al., 1991)
<i>R. etli</i> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	(Segovia et al., 1993)
<i>R. galegae</i> ( <i>Galega</i> , <i>Leucaena</i> )	(Lindstrom, 1989)
<i>R. gallicum</i> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	(Amarger et al., 1997)
<i>R. giardini</i> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	(Amarger et al., 1997)
<i>R. huautlense</i> ( <i>Sesbania</i> )	(Wang et al., 1998)
<i>R. mongolense</i> ( <i>Medicago</i> )	(van Berkum et al., 1998)
<i>R. hainanense</i> ( <i>Desmodium sinuatum</i> )	(Chen et al., 1997)
<i>R. indigoferae</i> ( <i>Indigofera</i> )	(Wei et al., 2002)
<i>R. loessense</i> ( <i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i> )	(Wei et al., 2003)
<i>R. sullae</i> ( <i>Hedysarum coronarium</i> )	(Squartini et al., 2002)
<i>R. yanglingense</i> ( <i>Amphicarpaea trisperma</i> ; <i>Coronilla varia</i> ; <i>Gueldenstaedtia multiflora</i> )	(Tan et al., 2001)
<i>R. undicola</i> ( <i>Neptunia natans</i> )	(Young et al., 2001)
<b>Bradyrhizobium (Bradyrhizobiaceae)</b>	
<i>B. japonicum</i> ( <i>Glycine max</i> )	(Jordan, 1982)
<i>B. elkanii</i> ( <i>Glycine max</i> )	(Kuykendall et al., 1992)
<i>B. liaoningense</i> ( <i>Glycine max</i> )	(Xu et al., 1995)
<i>B. yuanmingense</i> ( <i>Lesperezia</i> sp.)	(Yao et al., 2002)
<i>B. canariense</i>	(Vinuesa et al., 2005)
<i>B. betae</i> ( <i>Beta vulgaris</i> )	(Rivas et al., 2004)

A utilização da técnica de perfis de plasmídeos é hoje uma poderosa ferramenta no estudo da diversidade genética de rizóbios. Variações nos perfis de plasmídeos de estirpes de espécies individuais de *Rhizobium* têm sido amplamente relatadas (Cadahia et al., 1986; Young e Wexler, 1988; Bromfield et al., 1987). Em solo do Egito, por exemplo, grande diversidade entre as estirpes de *Rhizobium* de trevo, lentilha e feijão foi constatada com a utilização dessa técnica (Moawad et al., 1998). No caso de determinadas espécies de rizóbio, como, por exemplo, *R. leguminosarum* biovar viceae, num mesmo sorogrupo, consideráveis variações nos perfis de plasmídeos foram encontradas entre isolados de campo (Brockman e Bezdicek, 1989).

Os métodos eletroforéticos são facilmente adaptados para a comparação de muitas amostras. A verificação de grande variação na estrutura dos lipopolissacarídeos e no seu comportamento eletroforético tornou possível o uso de perfis desses compostos como um critério para diferenciação entre isolados (de Maagd et al., 1988). Esse método é, algumas vezes, o mais adequado e discriminatório para a identificação de

estirpes de *Bradyrhizobium* do que os perfis eletroforéticos de plasmídeos e proteínas. Nas ilhas Canárias, Santamaria et al. (1997) caracterizaram 27 isolados de *Bradyrhizobium* e um de *Rhizobium* capazes de nodular leguminosas arbustivas indígenas. Esses isolados apresentaram grande diversidade antigênica, que pareceu estar associada à grande diversidade estrutural dos seus lipopolissacarídeos (os principais determinantes antigênicos). Os 28 isolados estudados produziram 22 perfis eletroforéticos facilmente distinguíveis. Não foi observada nenhuma correlação entre os perfis de lipopolissacarídeos dos isolados e a planta da qual eles foram obtidos, ou sua origem geográfica.

**Tabela 3.** Gêneros e espécies de *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium* que nodulam raízes de leguminosas. Gêneros e espécies em parênteses referem-se às leguminosas hospedeiras.

<b><i>Sinorhizobium</i> (Rhizobiaceae)</b>	<b>(Chen et al., 1988)</b>
<i>S. meliloti</i> (Melilotus, Medicago, Trigonella)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. fredii</i> (Glycine)	(Jarvis et al., 1992)
<i>S. sahelense</i> (Sesbania)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. teranga</i> (Sesbania, Acacia)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. xinjiangensis</i> (Glycine max)	(Chen et al., 1988)
<i>S. arboris</i> (Acacia senegal, Prosopis chilensis)	(Nick et al., 1999)
<i>S. medicae</i> (Medicago)	(Rome et al., 1996)
<i>S. kostiense</i> (Acacia senegal, Prosopis chilensis)	(Nick et al., 1999)
<i>S. morelense</i> (Leucaena leucocephala)	(Wang et al. 2002b)
<i>S. kummerowiae</i> (kummerowia stipulacea)	(Wei et al., 2002)
<i>S. americanus</i> (Acacia spp.)	(Toledo et al., 2003)
<i>S. indiaense</i> (Sesbania rostrata)	(Ogasawara et al., 2003)
<i>S. abri</i> (Abrus precatorius)	(Ogasawara et al., 2003)
<b><i>Azorhizobium</i> (Hyphomicrobiaceae)</b>	<b>(Dreyfus et al., 1988)</b>
<i>A. caulinodans</i> (Sesbania)	(Dreyfus et al., 1988)
<b><i>Mesorhizobium</i> (Phyllobacteriaceae)</b>	<b>(Jarvis et al., 1997)</b>
<i>M. loti</i> (Lotus)	(Jordan, 1982; Jarvis et al., 1997)
<i>M. ciceri</i> (Cicer arietinum)	(Nour et al., 1994; Jarvis et al., 1997)
<i>M. tianshanense</i> (Glycyrrhiza pallidiflora, Swansonia, Glycine, Caragana, Sophora)	(Chen et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
<i>M. mediterraneum</i> (Cicer arietinum)	(Nour et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
<i>M. huakuii</i> (Astragalus)	(Chen et al., 1991; Jarvis et al., 1997)
<i>M. amorphae</i> (Amorpha fruticosa)	(Wang et al., 2002b)
<i>M. plurifarium</i> (Acacia, Prosopis, Leucaena)	(de Lajudie et al., 1998a)
<i>M. chacoense</i> (Prosopis alba)	(Velazquez et al., 2001)
<i>M. septentrionale</i> (Astragalus adsurgens)	(Gao et al., 2004)
<i>M. temperatum</i> (Astragalus adsurgens)	(Gao et al., 2004)

**Tabela 4.** Gêneros de rizóbio e os locais onde já foram isolados <sup>(1)</sup>

Gêneros	Locais de isolamento
<i>Rhizobium</i>	Disseminado mundialmente
<i>Bradyrhizobium</i>	África, Ásia, Austrália, Europa, América do Sul e do Norte, Região Ártica
<i>Mesorhizobium</i>	África, Ásia, América do Sul e do Norte, Europa, Austrália
<i>Sinorhizobium</i> <sup>(2)</sup>	Ásia, África, Europa, América do Sul e do Norte
<i>Azorhizobium</i>	África e Ásia

<sup>(1)</sup> Adaptada de Sessith et al. (2002). <sup>(2)</sup> Existe *S. meliloti* na Austrália que pode ter co-evoluído com o *Trigonella* indígena.

As similaridades de resultados, algumas vezes obtidos, entre diferentes técnicas, parece depender, em parte, do hospedeiro do qual as estirpes foram obtidas. Moawad et al. (1998) mostraram similaridades entre os sorotipos de isolados de lentilha e seus padrões de resistência intrínseca a antibióticos (RIA). Entretanto, essas similaridades não foram encontradas entre os sorogrupos de isolados de feijão e trevo e seus grupos RIA. Isso demonstra que os resultados da sorologia são menos variáveis do que a RIA em estirpes de *R. leguminosarum* e que essa técnica pode ser usada como ferramenta complementar, associada a métodos sorológicos, para identificar e discriminar estirpes de *R. leguminosarum*.

Dentre as técnicas genotípicas pode ser citada a eletroforese de enzima multiloco que é amplamente utilizada para fornecer informações sobre variação genética dentro da espécie e para avaliar a estrutura genética de populações naturais (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Métodos baseados na PCR, como RAPD, são também empregados para análise da variação genética dentro de espécies de rizóbio. O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA (RFLP) usado em conjunto com uma variedade de sondas de DNA tem sido comumente utilizado para avaliar a diversidade genética, a variação genética dentro de espécie e para inferir sobre a estrutura das populações de rizóbio no solo (Bromfield et al., 1998). Análises dos padrões de bandas produzidas pelo PCR-RFLP do gene *16S rRNA* ou genes simbióticos (*nod* e *nif*) são utilizadas para distinguir rizóbios em nível de espécie e para inferir sobre relacionamentos filogenéticos (Laguerre et al., 1994). Análise PCR-RFLP da região espaçadora intergênica (IGS) entre os genes *16S* e *23S rRNA* é empregada com sucesso para detectar variação genética dentro de uma espécie particular de rizóbio (Laguerre et al., 1996). O seqüenciamento do DNA dos genes *16S* ou *23S rRNA* é útil para estimar as relações evolucionárias entre rizóbios (Prévost e Bromfield, 2003).

A troca de sinais moleculares entre a planta e o rizóbio é essencial para que a nodulação ocorra; pouco, porém, é conhecido sobre os aspectos da interação que favorecem uma estirpe em relação à outra, quando as plantas são expostas a diferentes populações de rizóbios (Demezas et al., 1995). Nesse sentido, estudos para avaliar a diversidade destas bactérias deveriam utilizar grande número de plantas armadilhas.

O isolamento do rizóbio deveria ser feito de poucos nódulos retirados da porção mais velha da raiz, para evitar tendências de se isolar aquelas estirpes com maior capacidade de se multiplicar em meio artificial (Handley et al., 1998). O guandu (*Cajanus cajan* L.) é considerada uma eficiente planta hospedeira armadilha para o estudo da diversidade de rizóbios (Coutinho et al., 1999). Apresenta baixa especificidade hospedeira, sendo nodulado por isolados de crescimento rápido e lento. Outros trabalhos demonstram a importância da planta hospedeira no estudo da diversidade de rizóbios no solo (Rodríguez-Navarro et al., 2000; Bala et al., 2003). Interações entre planta hospedeira e populações indígenas de rizóbios são encontradas até mesmo em nível de cultivares (Rodríguez-Navarro et al., 2000).

Em alguns locais, como, por exemplo, nos solos do continente africano, a grande diversidade de populações de rizóbios somente recentemente foi descrita (Mpeperekí et al., 1997). Rizóbios nativos de caupi, em solos da Nigéria, são provavelmente o único grupo que tem sido estudado com algum detalhe (Eaglesham et al., 1987; Sinclair e Eaglesham, 1984). No Zimbábue, a grande diversidade de rizóbios nativos de caupi aponta para a possível existência de várias espécies ainda não identificadas, embora elas compartilhem suas características fisiológicas e culturais com estirpes de espécies definidas (Mpeperekí et al., 1997). Evidências encontradas em solos africanos demonstram que os rizóbios de caupi não são, possivelmente, todos de crescimento lento.

No Senegal, oeste da África, isolados de rizóbios obtidos de *Crotalaria* spp. têm revelado a presença de estirpes de rápido e lento crescimento (Samba et al., 1999). Análises moleculares demonstraram que as estirpes de crescimento lento são relacionadas a *Bradyrhizobium japonicum*, enquanto as de crescimento rápido não são relacionadas a qualquer estirpe de referência e constituem um grupo novo de rizóbios.

Rizóbios indígenas de crescimento lento, que nodulam soja, foram encontrados em solos do Zimbábue (Davis e Mpeperekí, 1995 citados por Mpeperekí et al. 1997), onde os isolados mostraram similaridades culturais e sorológicas com a espécie *Bradyrhizobium elkanii*.

Na China e no Vietnã, considerável diversidade genética foi também encontrada entre rizóbios de crescimento rápido que nodulam a soja (Saldaña et al., 2003). Os isolados provenientes da China mostraram maiores níveis de diversidade do que as estirpes oriundas do Vietnã. Ainda na China, Chen et al. (2005) demonstraram que 29 estirpes de rizóbio de crescimento lento foram todas agrupadas com *S. fredii* USDA205 e *S. xinjiangensis* CCBAU110, enquanto que 23 estirpes de rizóbio de crescimento lento foram altamente relacionadas com *B. japonicum* e *B. liaoningensis*. Na província de Hubei, na China, foi encontrada alta diversidade de *S. fredii* capaz de nodular a soja. A análise fisiológica e os perfis de plasmídeos e de proteínas totais foram as técnicas que melhor refletiram esta biodiversidade (Camacho et al., 2002). No norte da Tailândia, Yokoyama et al. (1996) relataram a ocorrência de um grupo de bradirizóbios em soja geneticamente distinto de *B. japonicum* e de *B. elkanii*. Nesse local, a distribuição e as características genéticas dos bradirizóbios obtidos em áreas cultivadas com soja ainda são pouco documentadas.

No Paraguai, nos estados de Alto Paraná e Itapúa, alta diversidade foi encontrada entre os isolados de rizóbio de crescimento rápido ou lento, obtidos de plantas de soja, com a maioria deles representando estirpes únicas. Muitos isolados apresentaram características associadas tanto a *B. elkanii* quanto a *B. japonicum* (Chen et al., 2002). No Brasil, o isolamento de rizóbios de crescimento rápido de nódulos de soja foi descrito pela primeira vez por Hungria et al. (2001). As estirpes diferiram da espécie *S. fredii* em várias características. Os autores concluíram que embora a soja seja uma planta exótica no Brasil, várias estirpes indígenas de rizóbio podem também estabelecer uma simbiose eficiente com esta leguminosa.

Nos três centros de domesticação do feijoeiro (México, Equador-Peru e Argentina), *R. etli* ocorre predominantemente nos nódulos, enquanto *R. tropici* ainda não foi encontrado. Estirpes de *R. tropici* são mais adaptadas à nodulação em solos ácidos do que estirpes de *R. etli* (Graham et al., 1994), além de serem mais tolerantes a altas temperaturas (Pinto et al., 1998). Estirpes de *R. tropici* são também bem adaptadas a solos arenosos (Acosta-Durán e Martínez-Romero, 2002) e podem ser tolerantes a altas concentrações de sais (Priefer et al., 2001). Sugere-se que a árvore tropical, *Gliricidia sepium*, nativa das Américas é o hospedeiro natural de *Rhizobium tropici*.

Não existem relatos sobre a ocorrência de *R. gallicum* e *R. giardinii* em nódulos de feijão provenientes dos centros de origem nas Américas (Martínez-Romero, 2003). No Brasil, tanto *R. tropici* quanto *R. etli*, *R. giardinii* e *R. leguminosarum* são encontrados em nódulos de feijão (Hungria et al., 2000; Mostasso et al., 2002; Grange e Hungria, 2004). Adicionalmente, rizóbios dos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* foram também isolados do feijoeiro no Brasil (Grange e Hungria, 2004), confirmando a natureza promíscua dessa leguminosa.

Rizóbios nativos que nodulam feijão, em solos africanos, são taxonomicamente relacionados a *R. tropici* no leste e sul da África (Anyango et al., 1995) e a *R. tropici* e *R. etli* na África Central (Tjahjoleksono, 1993). No oeste da África, Senegal e Gâmbia, limitada diversidade genética é encontrada entre isolados de feijão pertencentes a *R. tropici* tipo B e a *R. etli* (Diouf et al., 2000). Contrariamente a esses resultados, em solos da Etiópia, *R. leguminosarum* é, possivelmente, a espécie que predomina na simbiose com o feijoeiro (Beyene et al., 2004). Na Jordânia, isolados obtidos de nódulos de feijão foram identificados como *R. tropici* e *R. etli*, com predominância da última espécie (Tamimi e Young, 2004). Tipos distintos de rizóbios que nodulam *Phaseolus vulgaris* são encontrados em solos da Tunísia (Mhamdi et al., 1999). Nesse local, uma parte dos isolados mostrou alta similaridade com *Rhizobium gallicum*, isolado de feijão comum na França, enquanto a outra mostrou algumas características do grupo *R. etli*-*R. leguminosarum*. Um terço dos isolados não foi relacionado a qualquer das cinco espécies de *Rhizobium* que nodulam o feijão. A estrutura das populações de rizóbio, em solo da Tunísia, variou com a localização geográfica e com a presença ou não do hospedeiro. No Egito, Shamseldin et al. (2005) constataram alta diversidade genética entre isolados de rizóbio obtidos de nódulos do feijoeiro. As bactérias foram classificadas como *R. etli* e *R. gallicum*. Um terceiro grupo relacionou-se filogeneticamente a *R. radiobacter* (inicialmente *Agrobacteriu tumefaciens*). *Rhizobium etli* e *R. gallicum* exibiram eficiência simbiótica dependente da cultivar.

A estreita diversidade genética de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* encontrada na Inglaterra e França pode estar ligada ao fato de o feijão ser uma cultura introduzida na Europa (Laguerre et al., 1993). A co-ocorrência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici* tipo A foi observada em três solos arenosos e ácidos da França. Usando perfis de plasmídeos foram demonstradas diferentes predominâncias de espécies de rizóbio em cada local estudado. Ainda na França (Amarger et al., 1997), como também na Áustria e México (Sessitsch et al., 1997), alguns isolados obtidos de nódulos de feijão foram descritos como *R. gallicum*, apesar de mostrarem algumas diferenças nas hibridizações do DNA total.

Nos solos da Espanha pelo menos cinco espécies de rizóbio nodulam *Phaseolus vulgaris* (Herrera-Cervera et al., 1999), ou seja, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum*, *R. giardinii* e estirpes que se assemelham a *S. fredii*, com predominância do *R. etli* bv. *phaseoli*. As estirpes de *Sinorhizobium* não nodulam soja, de modo que análises adicionais são requeridas para esclarecer suas posições taxonômicas. A tabela 5 mostra, de forma resumida, os locais onde foram isoladas espécies de *Rhizobium* associadas ao *Phaseolus vulgaris*.

**Tabela 5.** Espécies de *Rhizobium* isoladas de nódulos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) <sup>(1)</sup>

	Locais de isolamento
<i>R. etli</i>	México, Colômbia, Equador-Peru, Argentina, Brasil, Senegal, Gâmbia, Tunísia, Espanha, Áustria, USA
<i>R. tropici</i>	Brasil (tipos A, B e outros), Colômbia (tipo B), França (tipo A), Marrocos, Quênia, Senegal, Gâmbia (tipo B)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Inglaterra, França, Espanha, Colômbia, Brasil, Tunísia
<i>R. gallicum</i>	França, Áustria, México (bv. <i>gallicum</i> somente), Tunísia, Espanha, Egito
<i>R. giardinii</i>	França, Espanha, Brasil

<sup>(1)</sup> Adaptada de Martínez-Romero (2003).

Rizóbios isolados de *Leucaena leucocephala*, em solos mexicanos, onde essa planta é nativa, apontam para uma alta diversidade dessas bactérias (Wang et al., 1999b). Apesar de a leucena ser considerada uma planta hospedeira promíscua e nodular com bactérias de pelo menos três gêneros filogeneticamente relacionados, a comunidade de rizóbios naqueles locais varia entre as cultivares. *L. leucocephala* é também considerado o hospedeiro adequado para diferenciar estirpes de *R. tropici* e *R. etli* (Segovia et al., 1993) e *R. etli* bv. *mimosae* de *R. etli* bv. *etli* (Wang et al., 1999a). A existência de estirpes de *M. plurifarium*, em solos mexicanos, como microssimbiontes nativos de *L. leucocephala*, foi também relatada. Essas estirpes formaram populações geneticamente diversas no solo e foram capazes de formar nódulos em *P. vulgaris* e *S. herbacea* (Wang et al., 2003). Ainda em solos mexicanos foi constatada grande diversidade genética na comunidade de *Bradyrhizobium*, isolada de espécies de *Lupinus* (Barrera et al., 1997).

Em solos de Taiwan foi encontrada alta diversidade de populações de rizóbios indígenas associados com *Sesbania cannabina* (Chen e Lee, 2001). Os isolados obtidos foram mais filogeneticamente relacionados a estirpes de *Sinorhizobium* e *R. huautlense*. Embora seja relatado que os genes *nifH* em isolados de sinorizóbios de árvores leguminosas poderiam ser divididos em dois grupos filogeneticamente distintos, com base em suas localizações, i.e., África ou América Latina (Haukka et al., 1998), as relações filogenéticas dos isolados de *S. cannabina*, relacionados ao gênero *Sinorhizobium*, em Taiwan, são aparentemente diferentes. Na Índia, *S. saheli*, *S. meliloti* e *R. huautlense* foram isolados dos nódulos de raízes de *S. sesban*, *S. algyptica* e *S. rostrata* (Sharma et al., 2005). Embora a ocorrência desses diferentes gêneros de rizóbio tenha sido anteriormente descrita, o trabalho de Sharma et al. (2005) é o primeiro relato da ocorrência de gêneros diferentes de rizóbio em uma mesma planta hospedeira (*S. sesban*) e na mesma região geográfica. Estirpes de rizóbio isoladas de *Sesbania* e *Acacia* na África foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Ba et al., 2002; Odee et al., 2002). No Uruguai, leguminosas, tais como *S. sesban* ou *Acacia caven* podem ser noduladas por rizóbios de crescimento rápido ou lento, que não foram identificados em nível de espécie (Frioni et al., 2001). Resultados similares foram obtidos com *S. sesban* e *Acacia saligna* no Egito (Swelin et al., 1997). Em Porto Rico, *R. gallicum* e *R. tropici* nodulam espécies de *Sesbania*, *Caliandra*, *Poitea*, *Piptadenia*, *Neptunia* e *Mimosa*; estas leguminosas não haviam sido previamente consideradas como hospedeiras desses rizóbios (Zurdo-Piñeiro et al., 2004). No México, árvores leguminosas como *Gliricidia septium* é nodulada pelo *R. tropici* tipos A e B, *Sinorhizobium* spp. e *R. etli* bv. *phaseoli* (Acosta-Durán et al., 2002). Na África (norte e sul da região do Saara), a maioria das estirpes de rizóbio isolada de *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* pertence aos gêneros *Sinorhizobium* e *Mezorhizobium* (Ba et al., 2002).

O gênero *Astragalus* inclui cerca de 1500-2000 espécies, sendo um dos maiores gêneros dentro da família Leguminosae. Apesar disso, poucos trabalhos sobre taxonomia de rizóbio associados a esse gênero têm sido feito. Rizóbios isolados de *Astragalus sinicus* na China foram classificados como *Mesorhizobium huakuii* (Chen et al., 1991). Estudos sobre a diversidade genética de rizóbios de *Astragalus adsurgens* na China demonstraram que essa leguminosa pode ser nodulada por linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Gao et al., 2001). Diferentes grupos de rizóbio foram também definidos entre isolados e outras espécies de *Astragalus* na China e em outros países (Laguerre et al., 1997; Wdowiak e Malek, 2000).

No Brasil as diferentes condições geoambientais exercem um forte efeito sobre a diversidade de rizóbios (Martins et al., 1997). Na região Nordeste, análises dos isolados de caupi de diferentes locais mostraram um aumento na proporção de rizóbios de crescimento rápido, no sentido da costa para a região semi-árida. Fenótipos *Hup*<sup>+</sup> foram predominantes nessa parte do território brasileiro. Em solos de cerrado, verifica-se alto grau de diversidade genética nas populações indígenas de *Rhizobium* que nodulam *Phaseolus vulgaris* (Sá et al., 1997).



**Tabela 6.** Resumo de alguns trabalhos realizados nos últimos anos para avaliação da diversidade genética de rizóbios em leguminosas.

	Local	Hospedeiro	Resultados
Parker e Lunck, 2000	Panamá	<i>Platypodium elegans</i> <i>Machaerium milleflorum</i> <i>Machaerium arboreum</i>	Bactérias que nodulam as raízes constituem um grupo diverso de genótipos relacionados ao <i>B. japonicum</i>
Ulrich e Zaspel, 2000	Alemanha	<i>Rodinia pseudoacacia</i> L.	Alta diversidade fenotípica e filogenética entre as estirpes de rizóbio; A maioria dos isolados foi classificada no gênero <i>Mesorhizobium</i>
Aguilar et al., 2001	Argentina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i> foi a espécie predominante em nódulos de feijão
Jebara et al., 2001	Tunísia	Medicago	Alta diversidade genética entre estirpes de <i>Sinorhizobium</i> .
Seguin et al., 2001	USA e Rússia	<i>Trifolium ambiguum</i>	Baixa diversidade genética de rizóbios obtidos nos EUA comparativamente à Rússia, que é o centro de origem do <i>Trifolium ambiguum</i>
Yao et al., 2002	China e EUA	<i>Lespedeza</i> spp.	A maioria dos isolados dos EUA foi identificada como <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> ; Os isolados da China foram classificados, principalmente, como <i>Sinorhizobium saheli</i> e <i>B. yuanmingense</i>
You et al., 2002	Guam	<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> C. juncea	A maioria dos isolados obtidos foi similar ao <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Jarabo-Lorenzo et al., 2003	Vários países	<i>Lupinus</i> e <i>Ornithopus</i> sp	<i>Lupinus</i> é um hospedeiro promíscuo que é nodulado por rizóbios com diferentes genótipos que poderiam pertencer a várias espécies de <i>Bradyrhizobium</i>
Mutch et al., 2003	Jordânia	<i>Vicia faba</i>	Sete isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> foram obtidos

Tabela 6. Conclusão

	Local	Hospedeiro	Resultados
Ballard et al., 2004	Austrália	<i>Pisum sativum</i> L.	As estirpes de rizóbio naturalizadas nos solos ao sul da Austrália são geneticamente diversas e diferentes das estirpes que usadas em inoculantes comerciais.
Wolde-meskel et al., 2004	Etiópia	Leguminosas lenhosas exóticas e nativas	Considerável diversidade de rizóbios indígenas no solo; 29% das estirpes foram ligadas a membros de <i>Agrobacterium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> ou <i>Sinorhizobium</i> ; 71% das estirpes não se relacionaram às espécies de referência utilizadas no estudo; Espécies de leguminosas exóticas estabeleceram simbiose com estirpes de somente um grupo genômico específico; Espécies de leguminosas indígenas foram noduladas por grupos diversos, genômica e metabolicamente.
Liu et al., 2005	China	<i>Wisteria sinensis</i> <i>Cercis racemosa</i> <i>Amorpha fruticosa</i>	Foram encontradas 17 espécies possivelmente pertencentes aos gêneros <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> e <i>Rhizobium</i> , além de linhagens não definidas, entre os 59 isolados obtidos.
Yang et al., 2005	China	<i>Arachis hypogaea</i>	Considerável diversidade nas características fenotípicas e genotípicas foi observada entre isolados de <i>Bradyrhizobium</i> obtidos de diferentes regiões geográficas na China
Wolde-Meskel et al., 2005	Etiópia	Espécies leguminosas agrofloretais	Encontrado vários grupos de rizóbios não relacionados aos gêneros conhecidos
Martyniuk et al., 2005	Polónia	Hospedeiro não definido Amostras de solo coletadas em diferentes regiões	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> = encontrado em 96% dos solos; <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> = encontrado em 95% dos solos; <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> = encontrado em 96% dos solos; <i>Bradyrhizobium</i> sp ( <i>Lupinus</i> ) = 42% dos solos possuíam de alta a moderada comunidade; <i>S. meliloti</i> = somente 7,5% dos solos possuíam de alta a moderada população

Embora a acidez do solo seja considerada, em muitas situações, um fator de estresse, a diversidade de rizóbios nem sempre é diminuída nessas condições. A diferença chave na comunidade de bactérias entre solos de baixo e alto pH estaria nos tipos predominantes de rizóbios (Anyango et al., 1995). A diversidade genética de populações de *Rhizobium* isoladas de grão de bico, oriundos de diferentes regiões de Portugal, foi baixa em solos ácidos e alta entre os isolados de solos neutros (Laranjo et al., 2001). Em solos da Índia, com diferentes valores de pH, foi constatada grande diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* de feijão mungo e de caupi (Saleena et al., 2001). Comparativamente aos solos ácidos a diversidade é menor em solos salinos. Locais de alta salinidade constituem exemplos de um ambiente extremo, onde relativamente pequena diversidade de espécies microbianas pode ser encontrada.

A presença de metais pesados no solo é descrita como um dos fatores responsáveis pela variação na diversidade de rizóbios. Alterações radicais são constatadas na população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, em solos sem longo histórico de cultivo do trevo, contaminados por metais pesados em decorrência da aplicação de lodo de esgoto. Em solos onde essa leguminosa é cultivada com frequência, porém, a presença de metais pesados pode não influenciar a diversidade de rizóbios em consequência da adaptação das bactérias àqueles elementos.

Historicamente, a diversidade de rizóbios tem sido avaliada com bactérias isoladas de nódulos; recentes estudos indicam, porém, que existe uma diversidade maior de rizóbios no solo do que se pressupunha anteriormente. Os rizóbios estão sendo encontrados como endofíticos ou rizobactérias de plantas não-leguminosas e muitos deles têm mostrado efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas. A contribuição desses rizóbios para a fixação biológica do nitrogênio é ainda obscura e mais pesquisas são necessárias para elucidar sua diversidade e mecanismos de interação com as plantas. A tabela 6 apresenta, de forma resumida, alguns trabalhos realizados nos últimos anos sobre a diversidade de rizóbios em leguminosas.

## Referências

- ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.178, p. 161-164, 2002.
- AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 181-188, 2001.
- AMARGER, N., MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 996-1006, 1997.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pH. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p.4016-4021, 1995.

BA, S.; WILLEMS, A.; de LAJUDIE, P.; ROCHE, P.; JEDER, H.; QUATRINI, P.; NEYRA, M.; PROMÉ, J.C.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; LORQUIN, J. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p. 130-146, 2002.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p. 917-930, 2003.

BALLARD, R.A.; CHARMAN, N.; MCINNES, A.; DAVIDSON, J.A. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1347-1355, 2004.

BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of Bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 1086-1091, 1997.

BEIJERINCK, M.W. Die Bacterien der Papilionaceen-knöllchen. **Botanische Zeitung**, v.46, p. 797-804, 1888.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (ED. GARRITY, GEORGE, M.), Springer-Verlag, New York, 2001.

van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbiosis with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.13-22, 1998.

BEYENE, D.; KASSA, S.; AMPY, F.; ASSEFFA, A.; GEBREMEDHIN, T.; van BERKUM, P. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archives of Microbiology**, v.181, p. 129-136, 2004.

BROCKMAN, F.J.; BEZDICEK, D.F. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the Palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and topography. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p.109-115, 1989

BROMFIELD, E.S.P.; THURMAN, N.P.; WHITWILL S.T.; BARRAN, L.R. Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. **Journal. General Microbiology**, v.133, p.3457-3466, 1987.

BROMFIELD, E.S.P.; BEHARA, A.M.P.; SINGH, R.S.; BARRAN, L.R. Genetic variation in local populations of *Sinorhizobium meliloti*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p. 1707-1716, 1998.

CADAHIA, E.; LEYVA, A.; RUIZ-ARGUESO, T. Indigenous plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) **Archive of Microbiology**, v.146, p. 239-244, 1986.

CAMACHO, M.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; DAZA, A.; ESPUNY, R.; BELLOGÍN, R.; OLLERO, F.J.; LYRA DE, M.C.C.P.; BUENDÍA-CLAVERÍA, A.; ZHOU, J.; LI, F.D.; MATEOS, C.; VELÁZQUEZ, E.; VINARDELL, J.M.; RUIZ-SAINZ, J.E. Soils of the Chinese Hubei Province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. **Systematic of Applied Microbiology**, v.25, p 592-602, 2002.

CHEN, M.; XIE, B.; HUANG, C.; XIE, F.; YANG, J.; ZHOU, Q.; ZHOU, J. Study on genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia in China. **Symbiosis**, v. 38, p. 123-144, 2005.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988

CHEN, W.X.; LI, G.H.; QI, Y.L. WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280,1991.

CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 153-159, 1995.

CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 870-873, 1997.

CHEN, W.; LEE, T. Genetic and phenotypic diversity of rhizobial isolates from sugarcane-*Sesbania cannabina*-rotation fields. **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.14-20, 2001.

CHEN, L.S.; FIGUEIREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 448-457, 2002.

COUTINHO, H.L.C.; VALÉRIA, M.O.; ANDREA, L.; MAIA, A.H.N.; GILSON, P.M. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p. 159-167, 1999.

DEMEZAS, D.H.; BEARDON, T.B.; STRAIN, S.R. WATSON, J.M. ; GIBSON, A.H. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. **Molecular Ecology**, v.4, p.209-220, 1995.

DIOUF, A.; de LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.50, p.159-170, 2000.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 89-98, 1988.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. Physiological and biochemical aspects of diversity of *Bradyrhizobium* sp (*Vigna*) from three West African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.575-581, 1987.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p. 332-346, 1889.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison, WI: University of Wisconsin, 1932.

FRIONI, L.; RODRÍGUEZ, A.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v.16, p. 275-282, 2001.

GAO, J.L.; TEREFWORK, Z.; CHEN, W.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, v.91, p. 155-168, 2001.

GAO, J.; TURNER, S.L.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; QIU, Y.H.; GU, J.; TEREFWORK, Z.; YOUNG, J.P.W.; LINDSTRÖM, K.; CHEN, W.X. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, 2003-2012, 2004.

GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p. 392-394, 1995.

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 198-207, 1994.

GRAHAM, P.H. Biological dinitrogen fixation:symbiotic In SYLVIA, D.H.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (eds) **Principles and application of soil microbiology**, Prentice Hall, Inc., New Jersey, p. 322-345, 1998.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p. 1389-1398, 2004.

HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J. E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.241-249, 1998.

HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J.P. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.419-426, 1998.

HELLRIEGEL, H., WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker-industrie deutschen Reiches**, p. 1- 234, 1888.

HENNECKE, H.; KALUZA, K.; THÖNYL, B.; FUHRMANN, M.; LUDWIG, W.; STACKEBRANDT, E. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen-fixing bacteria. **Archive of Microbiology**, v.142, p.342-348, 1985.

HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H.V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 87-97, 1999.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; ANDRADE, D. de S. The Brazilian experience with the soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. In PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. (Eds). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 515, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M. DE O.; COCA, R.G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p. 1349-1361, 2001.

IRISARRI, P.; MILNITSKY F.; MONZA, J.; BEDMAR, E.J. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. **Plant Soil**, v.180, p.39-47, 1996.

JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; DONATE-CORREA, J.; RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, M.; TEMPRANO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RUIZ-ARGÜESO, T.; LEÓN-BARRIOS, M. Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p. 611-623, 2003.

JARVIS, B.D.W.; GILLIS, M.; DELEY, J. Intra- and inter-generic similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistron of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.129-138, 1986.

JARVIS, B.D.W.; DOWNER, H.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, p. 93-96, 1992.

JARVIS, B.D.W.; SIVAKUMARAN, S.; TIGHE, S. W.; GILLIS, M. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. **Plant Soil**, v.184, p. 143-158, 1996.

JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to a new genus: *Mesorhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 895-898, 1997.

JEBARA, M.; MHAMDI, R.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 139-147, 2001.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p.501-505, 1992.

LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; RODRÍGUEZ-CASARTELLI, R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 412-419, 1993.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 56-63, 1994.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2019-2036, 1996.

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p. 4748-4758, 1997.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.369-382, 1998a.

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1277-1290, 1998b.

LARANJO, M.; RODRIGUES, R.; ALHO L.; OLIVEIRA, S. Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 662-667, 2001.

LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, p.365-367, 1989.

LIU, J.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p. 465-477, 2005.

LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agricultural Research**, v. 20, p.543-556, 1921.

de MAAGD, R.; van ROSSUM, C.; LUGTENBERG, B.J.J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.3782-3785, 1988.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the North-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1005-1010, 1997.



MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Review of Plant Science**, v. 15, p. 113-140, 1996.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 11-23, 2003.

MARTYNIUK, S.; ORÓN, J.; MARTYNIUK, M. Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.74, p. 83-86, 2005.

MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.313-320, 1999.

MOAWAD, H.; BADR EL-DIN, S.M.S.; ABDEL-AZIZ, R.A. Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v.204, p.95-106, 1998.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L. DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crop Research**, v.73, p. 121-132, 2002.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta - subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

MPEPEREKI, S.; MAKONESE, F.; WOLLUM, A.G. Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. **Symbiosis**, v.22, p.275-292, 1997.

MUTCH, L.A.; TAMIMI, S.M.; YOUNG, J.P.W. Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p. 709-714, 2003.

NICK, G.; RÄSÄNEN, L.A. DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. Genomic screening of rhizobia isolated from the root nodules of tropical leguminous trees using DNA-DNA dot-blot hybridization and rep-PCR. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 287-299, 1999.

NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 511-522, 1994.

NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.640-648, 1995.

ODEE, D.; HAUKKA, W.K.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; YOUNG, J.P.W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p. 801-811, 2002.

OGASAWARA, M.; SUZUKI, T.; MUTHOH, I.; ANNAPURNA, K.; ARORA, N.K.; NISHIMURA, Y.; MAHESWARI, D.K. *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. **Symbiosis**, v.34, p. 53-68, 2003

OLSEN, P.; WRIGHT, S.; COLLINS, M. ; RICE, W. Patterns of reactivity between a panel of monoclonal antibodies and forage *Rhizobium* strains. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 60, p.654-661, 1994.

PARKER, M.A.; LUNK, A. Relationships of bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergieae) on Barro Colorado island, Panama. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1179-1186, 2000.

PINTO, P.P.; RAPOSEIRAS, R.; MACEDO, A. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SÁ, N.M.H. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 295-300, 1998.

PRÉVOST, D.; BROMFIELD, E.S.P. Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 83, p. 311-319, 2003.

PRIEFER, U.B.; AURAG, J.; BOESTEN, B.; BOUHMOUCH, I.; DEFEZ, R.; FILALIMALTOUF, A.; MIKLIS, M.; MOAWAD, H.; MOUHSINE, B.; PRELL, J.; SCHLÜTER A.; SENATORE, B. Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 223-236, 2001.

RADEVA, G.; JURGENS, G.; NIEMI, M.; NICK, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTRÖM, K. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species : biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 192-205, 2001

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1271-1275, 2004.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; BUENDIA, A. M.; CAMACHO, M.; LUCAS, M.M.; SANTAMARIA, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p. 1601-1613, 2000.

ROME, S.; FERNANDEZ, M.P., BRUNEL, B., NORMAND, P., CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov. , isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.972-980, 1996.

DE SÁ, N.M.H.; KATTAH, L.S.; SELDIN, L.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Genomic heterogeneity within bean nodulating *Rhizobium* strains isolated from cerrado soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5/6, p.1011-1014, 1997.

SALDAÑA, G.; MARTINEZ-ALCÁNTARA, V.; VINARDELL, J.M.; BELLOGÍN, R.; RUÍZ-SAINZ, J.E.; BALATTI, P.A. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). **Archives of Microbiology**, v. 180, p. 45-52, 2003.

SALEENA, L.M.; LOGANATHAN, P; RANGARAJAN, S.N. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.276-281, 2001.

- SAMBA, R.T.; de LAJUDIE, P.; GILLS, M.; NEYRA, M.; BARRETO, M.M.S.; DREYFUS, B. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. **Symbiosis**, v.27, p.259-268, 1999.
- SANTAMARIA, M.; CORZO, J.; LEON-BARRIOS, M.; GUTIERREZ-NAVARRO, A.M. Characterization and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. **Plant and Soil**, v.190, p.143-152, 1997.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.
- SEGUIN, P.; GRAHAM, P.H.; SHEAFFER, C.C.; EHLKE, N.J.; RUSSELLE, M.P. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Trifolium ambiguum* in North America. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 81-85, 2001.
- SESSITSCH, A.; RAMÍREZ-SAAD, H.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A.D.L.; VOS, W.M. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 1097-1101, 1997.
- SHAMSELDIN, A.A.;Y.; VINUESA, P.; THIERFELDER, H.; WERNER, D. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian soils and display cultivar-dependent symbiotic efficiency. **Symbiosis**, v. 38, p. 145-161, 2005.
- SHARMA, R.S.; MOHMMED, A.; MISHRA, V.; BABU, C.R. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 57-67, 2005.
- SINCLAIR, M.J.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.247-251, 1984.
- SPRENT, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 401-405, 1995.
- SQUARTINI, A.; STRUFFI, P.; DÖRING, H.; SELENSKA-POBELL, S.; TOLA, E.; GIACOMINI, A.; VENDRAMIN, E.; VELÁZQUEZ, E.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; DAZZO, F.B.; CASELLA, S.; NUTI, M.P. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formely '*Rhizobium hedysarum*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1267-1276, 2002.
- STANLEY, J.; CERVANTES, E. Biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.9-19, 1991.
- SWELIM, D.M.; HASHÉM, F.M.; KUYKENDALL, L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p. 224-232, 1997.
- TAMIMI, S.M.; YOUNG, J.P.W. *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 193-200, 2004.

TAN, Z.Y.; KAN, F.L.; PENG, G.X.; WANG, E.T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W.X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 909-914, 2001.

TJAHJOLEKSONO, A. Caractérisation et diversité des souches de *Rhizobium* nodulant le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) en trois sites tropicaux. PhD thesis. University of Lyon, Villeurbanne, 1993.

TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 54-64, 2003.

ULRICH, A.; ZASPEL, I. Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating *Robinia pseudoacacia* L. **Microbiology**, v. 146, p. 2997-3005, 2000.

VELÁZQUEZ, E.; IGUAL, J.M.; WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ, M.P.; UM^NOZ, E.; MATEOS, P.F.; ABRIL, A.; TORO, N.; NORAMND, P.; CERVANTES, E.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1011-1021, 2001.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., na acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) from the Canary islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 569-575, 2005.

XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J. FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.706-711, 1995.

WANG, E.T.; van BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X.H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.687-699, 1998.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SANTOS, G. LOS; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1479-1491, 1999a.

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in mexican soils. **Molecular Ecology**, v.8, p.711-724, 1999b.

WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; WILLEMS, A.; FERNANDEZ-LÓPEZ, M.; REINHOLD-HUREK, B.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1687-1693, 2002a.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SUI, X.H.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; van BERKUM, P. *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa*, is native to American soils. **Archive of Microbiology**, v. 178, p. 301-305, 2002b.

WANG, E.T.; KAN, F.L.; TAN, Z.Y.; TOLEDO, I.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. **Archives of Microbiology**, v. 180, p. 444-454, 2003.

WDOWIAK, S.; MALEK, W. numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. **Current Microbiology**, v.41, p. 142-148, 2000.

WEI, G.H.; WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; ZHU, M.E.; CHEN, W.X. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2231-2239, 2002.

WEI, G.H.; TAN, Z.Y.; ZHU, M.E.; WANG, E.T.; HAN, S.Z.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 1575-1583, 2003.

WOLDE-MESKEL, E.; TEREFWORK, Z.; LINDSTRÖM, K.; FROSTEGARD, A. Metabolic and genomic diversity of rhizobia isolated from field standing native and exotic woody legumes in Southern Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p. 603-611, 2004.

WOLDE-MESKEL, E.; TEREFWORK, Z.; FROSTEGARD, A.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1439-1452, 2005.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 2219-2230, 2002.

YANG, J. K.; XIE, F.L.; ZOU, Q.; ZHOU, J.C. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 141-153, 2005.

YOKOYAMA, T.; ANDO, S.; MURAKAMI, T.; IMAI, H. Genetic variability of the common nod gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 1209-1218, 1996.

YOU, Z.; MARUTANI, M.; BORTHAKUR, D. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 577-584, 2002.

YOUNG, J.P.W.; WEXLER, W. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.2731-2739, 1988.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, v.133, p.87-94, 1996.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 89-103, 2001.

ZOU, X.H.; LI, F.D.; CHEN, H.K. Characteristics of plasmids in *Rhizobium huakuii*. **Current Microbiology**, v. 35, p. 215-220, 1997.

ZURDO-PIÑEIRO, J.L.; VELÁZQUEZ, E.; LORITE, M.J.; BRELLES-MARIÑO, G.; SCHRÖDER, E.C.; BEDMAR, E.J.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. **Systematic Applied Microbiology**, v. 27, p. 469-477, 2004.

# Capítulo 11

## Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo

Rogério MELLONI <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

O solo é considerado um crítico componente da biosfera, funcionando não somente como base para a produção de alimentos e fibra, mas também na manutenção da qualidade do ambiente local, regional e global (Glanz, 1995). Além dos graves problemas ambientais ligados à atividade humana como mudanças climáticas globais, depleção da camada de ozônio e sérias destruições da biodiversidade, a degradação e perda de terras produtivas são consideradas sérios problemas ecológicos (Lal, 1998). Pesquisas sobre a capacidade produtiva do solo indicaram que a degradação induzida pelo homem está em torno de 40% das terras agricultáveis mundiais (Oldeman, 1994). Um outro estudo feito por Darst & Dibb (1995) mostrou que a área disponível de terras aráveis, próprias para a produção agrícola, vem reduzindo de modo acentuado, com queda de quase 1% ao ano, em consequência do aumento da população mundial e da degradação de terras agrícolas pelo homem.

Segundo Staben et al. (1997), a degradação da qualidade do solo pelo cultivo é manifestada por processos erosivos, redução de matéria orgânica, perda de nutrientes, compactação do solo, redução de populações microbianas, de atividades enzimáticas e pH. Em outras áreas não agrícolas, como as de extração de minério, o ambiente solo é alterado devido ao desmatamento, remoção da camada superficial do solo e intenso revolvimento (Sawada, 1996), com impacto negativo imediato na microbiota do solo e seus processos (Carneiro, 2000; Melloni et al., 2003; Melloni et al. 2004; Melloni et al., 2006). Ainda, solos que recebem resíduos industriais são normalmente contaminados por metais pesados, comprometendo a qualidade dos mesmos (Chander et al., 1995; Soares et al., 2002; Moreira et al., 2004).

---

<sup>(1)</sup> Professor- Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Instituto de Recursos Naturais. Pesquisador do Grupo de Pesquisa "Solos e Meio Ambiente - SOMA" do CNPq. Av. BPS, 1303 - Pinheirinho, Caixa Postal 50, CEP 37500-903, Itajubá, MG. E-mail: rmelloni@unifei.edu.br

A conservação da qualidade do solo é particularmente importante nestes ecossistemas marginais, frágeis e ecologicamente sensíveis, pois a degradação pode ser irreversível, principalmente quando a pressão humana for excessiva (García & Hernández, 1997).

Para avaliar a qualidade do solo nos diversos sistemas podem ser utilizados atributos físicos, químicos e biológicos. Até cerca de dez anos atrás, os maiores enfoques eram dados aos dois primeiros, subestimando-se o papel da biota do solo em várias funções do solo. No entanto, muitos, se não a maioria, dos atributos físicos e químicos do solo exigidos para o máximo desenvolvimento vegetal são afetados diretamente pelos processos bióticos (Lee, 1994), destacando-se a importância dos microrganismos e seus processos no funcionamento e sustentabilidade de ecossistemas. A microbiota do solo participa da formação da estrutura do solo, controla a disponibilidade de nutrientes às plantas pela mediação nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, incluindo a fixação biológica do N e a ciclagem de P, e melhora as limitações químicas como pH ou níveis tóxicos de agrotóxicos e metais pesados, proporcionando maior desenvolvimento da comunidade vegetal nestes ambientes (Tate & Klein, 1985; Moreira & Siqueira, 2002).

Muitos atributos biológicos do solo como biomassa microbiana, atividade heterotrófica de microrganismos do solo e atividade de enzimas relacionadas a ciclos biogeoquímicos de nutrientes têm sido utilizados eficientemente como indicadores bioquímicos da qualidade do solo em áreas degradadas (García & Hernández, 1997; Wick et al., 1998; Carneiro, 2000; Schwenke et al., 2000), solos sob impacto de metais pesados (Melloni et al., 2000; Melloni et al., 2001a; Moreira et al., 2004), solos que recebem xenobióticos diversos (Cardoso & Fortes Neto, 1999; Cardoso & Serrano, 2001; Kaneshiro et al., 2005) ou aqueles submetidos a diferentes sistemas de uso (Knob et al., 2005; Nogueira et al., 2006).

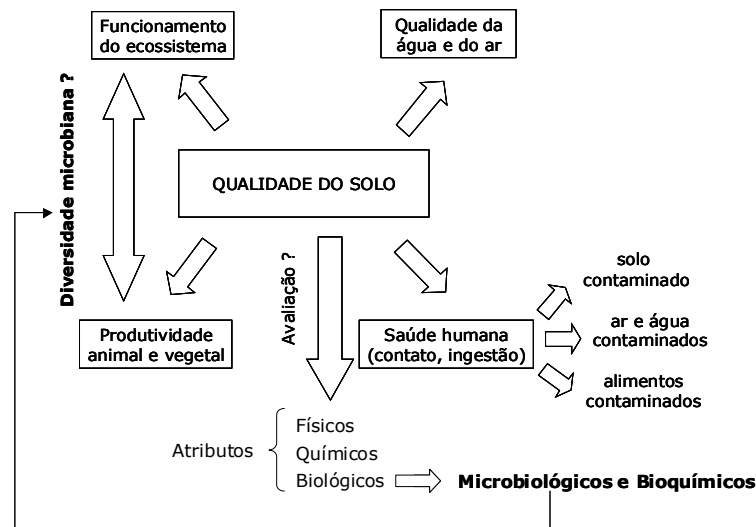
No entanto, apesar do importante papel dos microrganismos e seus processos na recuperação de áreas degradadas, são poucos os estudos que relacionam qualidade do solo com atributos microbiológicos, especificamente com a diversidade microbiana. Este capítulo tem por objetivos demonstrar a importância da utilização de indicadores microbiológicos na avaliação da qualidade do solo em sistemas degradados, destacando-se aspectos relacionados à diversidade microbiana e seus métodos mais simples de quantificação.

## 2. Importância dos Estudos de Qualidade do Solo

O conceito de qualidade do solo data de civilizações muito antigas (Doran et al., 1996) e compreende um subconjunto fundamental da qualidade ambiental. No final da década de 70 e durante os dez anos seguintes esteve muito associado ao conceito de fertilidade, sendo um solo considerado de alta qualidade quando se apresentava quimicamente rico (Zilli et al., 2003). No entanto, os conceitos foram



renovados e o solo de alta qualidade passou a ser visto de outra forma. Conforme Figura 1, a qualidade do solo pode ser definida como a capacidade do solo funcionar dentro de um ecossistema natural ou manejado, sustentar a produtividade animal e vegetal, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e não prejudicar a saúde humana (Karlen et al., 1997; Sposito & Zabel, 2003). O solo pode afetar a saúde do homem de três modos: diretamente pelo contato com solo contaminado por produtos tóxicos ou radioativos; indiretamente pela contaminação do ar e água, e pela ingestão de alimentos contaminados por metais pesados, agrotóxicos, etc. (Doran et al., 1996).



**Figura 1.** Esquema dos fatores governados pela qualidade do solo e os atributos utilizados para sua quantificação, com destaque para a diversidade microbiana.

Muito mais que o ar ou água, a qualidade do solo tem uma profunda influência na saúde e produtividade de um ecossistema. No entanto, diferentemente do ar ou água para os quais já existem padrões de qualidade, a definição e a quantificação da qualidade do solo são de difícil acesso, principalmente pela forte dependência de fatores externos como manejo, interações com o ecossistema e ambiente, prioridades sócio-econômicas e políticas, etc. No entanto, para manejar e manter o solo num estado aceitável para gerações futuras, deve-se priorizar os estudos da qualidade do solo e estes devem envolver as diversas funções do solo. Um ecossistema saudável é caracterizado pela integridade dos ciclos de energia e nutrientes, estabilidade e resiliência a perturbações ou estresses (O'Neill et al., 1986). Tanto a qualidade do solo quanto sua biodiversidade e resiliência são severamente limitadas em ambientes degradados e são muito sensíveis a perturbações antropogênicas (Freckman & Virginia, 1997). A resiliência do solo pode ser definida como a tolerância, capacidade de tamponamento ou a habilidade de regenerar-se diante de estresses diversos (Szabolcs, 1994). A biodiversidade do solo se refere à variedade de grupos taxonômicos incluindo bactérias, fungos, protozoários, nematóides, minhocas e artrópodes, mas neste capítulo a ênfase será dada aos primeiros dois grupos.

A diversidade microbiana do solo é normalmente avaliada como a diversidade de espécies ou diversidade genética, mais do que a diversidade estrutural e funcional. Contudo, em termos de qualidade do solo, estas duas últimas formas de diversidade podem ser mais importantes (Visser & Parkinson, 1992). Isto se deve à redundância funcional de microrganismos na qualidade do solo (Beare et al., 1995), onde o sistema pode se recuperar mesmo após um fator estressante eliminar parte de sua comunidade microbiana. A interrogação colocada na diversidade microbiana (Figura 1) como mediadora do funcionamento de ecossistema e produtividade vegetal expressa a pesquisa limitada sobre o assunto e a necessidade de extensas elucidações sobre o verdadeiro papel da diversidade na qualidade do solo.

Três tipos de fatores de estresse podem ser distinguidos: físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos mais importantes são temperaturas extremas, potenciais mátricos extremos (umedecimento e secagem), potenciais osmóticos, compactação e destruição da estrutura. Fatores químicos incluem extremos de índices de pH, excesso ou limitação de nutrientes orgânicos e inorgânicos, anaerobiose, salinidade e biocidas como metais pesados, poluentes radioativos, agrotóxicos e hidrocarbonetos. Fatores de estresse biológico incluem, entre outros, introdução de organismos exógenos com alta competitividade e crescimento descontrolado de organismos específicos como patógenos ou predadores. Raramente um fator opera de modo isolado, ou seja, um estresse físico, por exemplo, pode alterar condições químicas e biológicas, e estas afetarem direta ou indiretamente a microbiota e a qualidade do solo.

### 3. O que são Indicadores da Qualidade do Solo?

Um indicador é algo que aponta, indica, e pode ser uma propriedade, processo ou característica física, química ou biológica que pode ser medida para monitorar mudanças no solo. Um indicador do tipo ecológico pode ser uma espécie vegetal ou animal que indica, pela sua presença em determinada área, a existência de uma condição ambiental. Na maioria dos casos, uma espécie representativa é selecionada, e mudanças nesta espécie são utilizadas para substituir a avaliação de outros componentes biológicos do sistema. Muitos organismos ou grupos de organismos têm sido utilizados como indicadores ecológicos, incluindo nematóides, traças, pássaros, protozoários, cupins e minhocas (Turco & Blume, 1999).

Segundo Holloway & Stork (1991) e Visser & Parkinson (1992), um bom indicador ecológico deve preencher os seguintes critérios: 1) apresentar resposta rápida à perturbação; 2) refletir alguns aspectos de funcionamento do ecossistema; 3) ser economicamente viável; 4) ser universal na distribuição, apesar de mostrar especificidade individual a padrões temporais ou espaciais no ambiente; e 5) ser independente das estações do ano. Estes critérios, além de auxiliar na escolha dos indicadores, podem ser utilizados no desenvolvimento ou seleção de métodos mais adequados para estudo da comunidade microbiana do solo.

No entanto, um único indicador não pode ser utilizado nos estudos de qualidade de um sistema. Assim, um conjunto mínimo de atributos físicos, químicos e biológicos do solo deve ser utilizado para avaliar a sua qualidade e procedimentos estabelecidos

para identificar alterações na qualidade destes atributos. Um conjunto de indicadores básicos da qualidade do solo não pode ser previamente definido para emprego em solos degradados devido à grande variação de magnitude e importância entre os indicadores, e à discordância entre os cientistas e os produtores sobre a seleção desses indicadores.

Doran et al. (1996) elaboraram uma lista de atributos que afetam as funções ecológicas e a qualidade do solo, a qual inclui densidade, infiltração e capacidade de retenção de água, C e N orgânico total, condutividade elétrica, pH, nutrientes disponíveis, biomassa e atividade microbianas. Embora estes atributos possam ser úteis como indicadores da qualidade do solo, não estão necessariamente associados com a saúde do solo e a manutenção das suas funções ecológicas essenciais. Segundo van Bruggen & Semenov (2000), uma das razões para essa inconsistência pode ser a falta de sensibilidade de muitas dessas avaliações ao tempo de amostragem, ao manejo (cultivo, irrigação, incorporação de resíduos, fertilização, etc.) ou a eventos ambientais (chuva, etc.). Portanto, a escolha de indicadores para serem utilizados em áreas degradadas não é tarefa fácil e exige do pesquisador muito estudo, dedicação e paciência. No entanto, a avaliação e a atribuição de valores à qualidade do solo permitem: a) avaliação da política de uso da terra; b) identificação de áreas ou sistemas de manejo críticos; c) avaliação de práticas que degradam ou melhoram o solo; e d) ampliação do conhecimento e compreensão sobre manejo sustentável do solo. Com os valores médios obtidos por meio de vários indicadores, podem ser estabelecidos limites inferiores e superiores da qualidade do solo ou das condições físicas, químicas e biológicas adequadas (Figura 2).

Ao longo do tempo, se o valor obtido de um conjunto de indicadores ultrapassar o limite inferior pré-estabelecido, pode-se dizer que a qualidade do solo ou do sistema foi afetada e medidas devem ser tomadas para mitigar ou corrigir o problema.

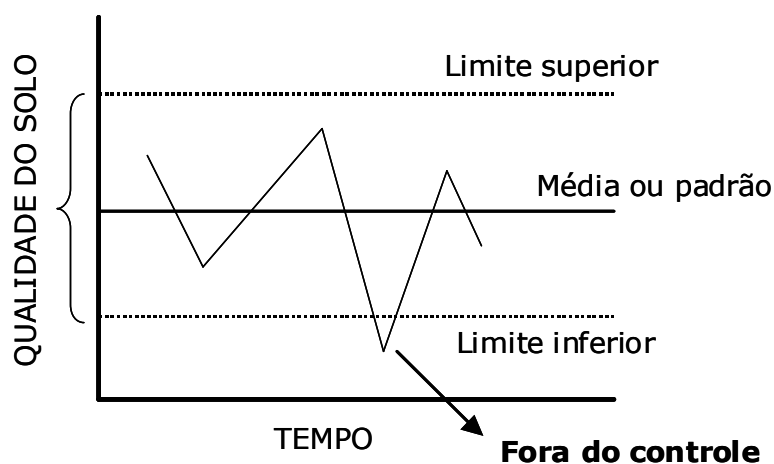


Figura 2. Representação da qualidade do solo, determinada por indicadores, em função do tempo. (FONTE: Larson & Pierce, (1994).

## 4. Indicadores Microbiológicos

### Definição

Indicador microbiológico pode ser definido como uma espécie de microrganismo ou grupo de microrganismos que indica, pela sua presença e atividade numa determinada área, a existência de uma condição ambiental específica. Historicamente, bactérias do grupo coliforme, ao qual pertencem os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, característicos do trato intestinal dos vertebrados, foram os primeiros indicadores microbiológicos utilizados na avaliação do ambiente (Brock & Madigan, 1991). Aspectos positivos ligados à praticidade de determinação, baixo custo e confiabilidade das metodologias empregadas, fazem com que atualmente, a presença de coliforme numa amostra ambiental seja ainda muito utilizada como indicador da qualidade sanitária da água ou do solo.

Os microrganismos apresentam grande potencial de utilização em estudos de qualidade do solo (Hofman et al., 2003) por apresentar as seguintes características: a) alta sensibilidade a perturbações antropogênicas (Pankhurst et al., 1997); b) correlações com diversas funções benéficas do solo, incluindo armazenamento e disponibilidade de água, decomposição de resíduos orgânicos, transformação e ciclagem de nutrientes, biorremediação, controle de fitopatógenos e outros; c) papel direto em muitos processos do ecossistema, incluindo conversão de nutrientes em formas disponíveis às plantas (Drinkwater et al., 1996), supressão de organismos nocivos (Oyarzun et al., 1998), formação da estrutura do solo e papel indireto em processos como infiltração de água; e d) facilidade de avaliação e baixo custo.

Há vários tipos de indicadores microbiológicos que podem ser utilizados em estudos da qualidade do solo em áreas degradadas. No entanto, pelo papel desempenhado no funcionamento de ecossistemas, neste capítulo abordar-se-á a diversidade microbiana e os métodos mais simples de sua avaliação em diferentes sistemas.

### Diversidade Microbiana e Métodos de Avaliação

A diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo tem sido bastante discutido, principalmente na última década com o surgimento e aprimoramento de técnicas de biologia molecular (Johnson et al., 2003). No entanto, pouca pesquisa tem sido feita para quantificar as relações benéficas entre diversidade microbiana, funcionamento do solo e qualidade vegetal, e sustentabilidade do ecossistema (Kennedy & Smith, 1995). Além disso, o desenvolvimento de métodos para avaliação direta da diversidade microbiana do solo tem sido lento, não havendo, atualmente, métodos simples que a quantifique ou indique alteração em função do manejo do solo (Turco & Blume, 1999). A utilização de índices de diversidade pode funcionar como bioindicador do efeito de estresses na comunidade microbiana (Atlas, 1984), mas é limitada pelo desconhecimento da composição de espécies microbianas no solo, as quais são obtidas, normalmente, em meios-de-cultura definidos.

A diversidade microbiana compreende a variedade de espécies num ecossistema, bem como a variabilidade genética dentro de cada espécie (Kennedy & Smith, 1995). Segundo Turco et al. (1994), os índices de diversidade microbiana têm sido utilizados para descrever o estado das comunidades microbianas e o efeito das perturbações naturais ou antropogênicas.

Estes atributos podem atuar como indicadores microbiológicos por mostrarem a estabilidade da comunidade e descrever a dinâmica ecológica de uma comunidade e os impactos de estresse naquela comunidade. Contudo, um fator limitante do sucesso de utilização destes índices é a complexidade da comunidade microbiana do solo e as múltiplas interações desta com o solo, as quais podem ser amenizadas aumentando o número de indicadores na avaliação da qualidade do solo.

Os métodos de contagem de microrganismos do solo em meios definidos (Atlas, 1984) e a utilização da microscopia direta desempenham papel importante nos estudos preliminares da diversidade microbiana do solo e, normalmente, empregam técnicas acessíveis a laboratórios. No entanto, métodos de caráter genético e, ou, bioquímico que envolvem estudos múltiplos de funções do solo e diferenças bioquímicas podem fornecer resultados mais confiáveis desta diversidade (Dick et al., 1996a) e serão brevemente apresentados neste capítulo.

## **5. Avaliação da Densidade e Diversidade Fenotípica Cultural de Microrganismos em Meios de Cultura Definidos**

A contagem de microrganismos do solo em meios de cultura definidos e posterior estudo de suas características é talvez o método mais comum de se avaliar a diversidade microbiana do solo (Atlas, 1984). Apesar de simples e rápido, este método é insensível a mudanças rápidas nas comunidades microbianas, além de avaliar uma pequena porção da comunidade total de microrganismos do solo.

A diversidade dos isolados depende muito do método utilizado no isolamento e do meio de cultura (Sorheim et al., 1989), da habilidade operacional do pesquisador, além da existência de microrganismos em estado viável, mas não cultivável (Roszak & Colwell, 1987). Torsvik et al. (1990), pela utilização de microscopia fluorescente, demonstraram que 99,5 a 99,9% das bactérias do solo não são cultiváveis nos meios tradicionais, mostrando a grande limitação deste método.

Em solos da Austrália, Pankhurst et al. (1995) avaliaram diferentes sistemas de cultivo (convencional, rotação de culturas, fertilização, cultivo mínimo) pela contagem de fungos, bactérias, actinomicetos totais e celulolíticos, e verificaram baixa sensibilidade destes microrganismos em discriminar esses sistemas, o que limitou a sua utilização como bioindicadores. Resultado semelhante foi obtido por Melloni et al. (2001b) em dois diferentes ecossistemas de mata e campo, no Sul de Minas Gerais, onde a densidade destes microrganismos, excetuando os solubilizadores de fosfato, não foi sensível na discriminação ambiental.

Uma área-modelo, compondo solos não degradados e solos degradados em processo de recuperação, utilizando estratégias diversas (espécies vegetais), foi estudada em Itajubá/MG, do ponto de vista microbiológico e bioquímico. Silveira et al. (2006), empregando meios de cultura diversos e específicos, verificaram que os atributos densidade de fungos, bactérias e solubilizadores de fosfato foram considerados bons indicadores da recuperação dos solos. Áreas não degradadas apresentaram valores em torno de 2,3; 3,0 e 4,2 vezes superiores àqueles obtidos em amostras de solo das áreas degradadas, respectivamente. Além disso, Nascimento & Melloni (2005) obtiveram valores 3,2 vezes superiores de microrganismos amonificantes em áreas não degradadas em relação àquelas consideradas degradadas. Esses resultados, entre muitos outros, permitiram concluir que a sensibilidade microbiana aos estresses e ao próprio manejo aplicado ao solo é extremamente elevada e isso confere aos atributos microbiológicos alto potencial de utilização nos estudos de avaliação do processo de recuperação de solos.

Para estudos de rizóbio, Graham (1976) apontou três características culturais simples que podem ser utilizadas com sucesso na classificação de isolados: taxa de crescimento, pH na reação do meio YMA (Vincent, 1970) e tipo de flagelo, útil até hoje para classificação em gênero. Posteriormente, Moreira (1991) aperfeiçoou esta avaliação com outras características fenotípicas de rizóbio como diâmetro médio de colônias, produção de goma e coloração das colônias em estudos de isolados da Amazônia e Mata Atlântica. Utilizando estas características, Melloni et al. (2006) avaliaram isolados de rizóbio em áreas de mineração de bauxita, aplicando, posteriormente, o índice de Shannon-Weaver –  $H'$  (Shannon & Weaver, 1949) para o cálculo da diversidade (Figura 3).

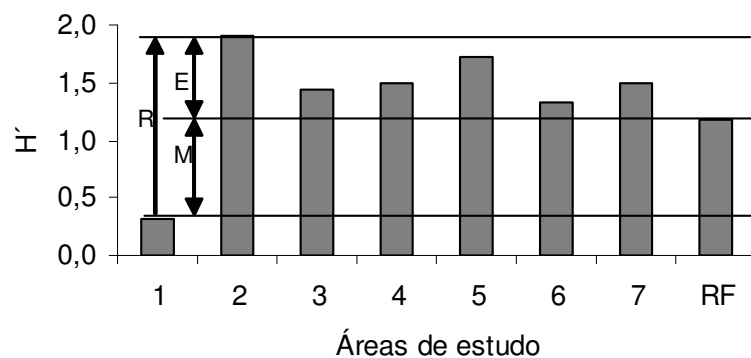
Neste estudo, a diversidade de rizóbio foi sensível aos efeitos negativos da mineração (M) e aos efeitos positivos das diferentes técnicas de reabilitação (R) empregadas, mostrando o grande potencial de utilização deste bioindicador nos estudos de qualidade de solos (Figura 3). Utilizando este indicador, foi possível verificar que todas as estratégias utilizadas, principalmente aquelas com braquiária e feijão-guandu ou com bracatinga, contribuíram para o processo de reabilitação, onde os valores de diversidade ultrapassaram o apresentado pela referência (E), caracterizando ganho extra.

Avaliando áreas degradadas e não degradadas, em Minas Gerais, Caldas et al. (2004) verificaram que a diversidade fenotípica cultural de isolados de rizóbio (por Shannon & Weaver) em áreas não degradadas chegou a 2,32 contra 0,35 naquelas degradadas, no período de inverno.

As mesmas características de rizóbio já tinham sido utilizadas por Pereira (2000) em diversos sistemas de uso da terra na Amazônia, a qual verificou maior diversidade de rizóbio em solos de floresta e a menor em áreas com monocultura e capoeira. Vários outros pesquisadores relataram redução da diversidade de rizóbio pelo revolvimento do solo agrícola (Chueire et al., 2000; Ferreira et al., 2000) ou pela monocultura (Lupwayi et al., 1998; Coutinho et al., 1999).

A sobrevivência, competitividade e eficiência simbiótica do rizóbio são limitadas por diversos fatores, como espécie e nutrição vegetal, baixa fertilidade do solo,

toxicidade por Al e Mn decorrente da acidez, altas temperaturas, baixa ou elevada umidade no solo, revolvimento, entre outros, condições estas comumente encontradas em solos degradados (Brockwell et al., 1995). A alta sensibilidade de rizóbio a vários fatores edafoclimáticos o torna indicador potencialmente importante na avaliação desses sistemas.



**Figura 3.** Diversidade ( $H'$ ) de isolados de rizóbio de caupi em áreas de mineração de bauxita. 1 (recém-minerada e com 6 meses de reabilitação com capim-gordura e feijão-guandu), 2 (braquiária e feijão-guandu com 2 anos), 3 (bracatinga e capim-gordura com 6 anos), 4 (espécies nativas com 10 anos), 5 (bracatinga com 14 anos), 6 (eucalipto com 16 anos), 7 (bracatinga e outras espécies nativas com 18 anos) e RF (área-referência, não minerada). R (efeito positivo da reabilitação em relação à área 1), M (efeito negativo da mineração em relação à RF), E (ganho extra de diversidade pela reabilitação, em relação à RF).

Após isolamento de diazotróficos endofíticos em meios de cultura considerados seletivos (NFb, JNFb e Fam), Melloni et al. (2004) caracterizaram os isolados obtidos de áreas de mineração de bauxita por meio da cor, diâmetro e consistência das colônias. Diversos grupos fenotípicos culturais foram formados, os quais variaram em função da época de amostragem do solo e da cobertura vegetal presente. Temperaturas e umidades mais elevadas e revegetação com gramíneas do tipo capim-gordura e braquiária contribuíram para a maior multiplicação destes microrganismos e maior facilidade de isolamento em laboratório. Pelo agrupamento dos isolados com estirpes-tipo de diferentes espécies, cerca de 63% deles apresentaram similaridade às estirpes-tipo das espécies *Burkholderia brasilensis*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum* spp. (*A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *A. irakense*). Posteriormente, isolados destas áreas foram avaliados por Nóbrega et al. (2004), quanto: ao tempo para surgimento de colônias isoladas, diâmetro médio das colônias, produção de goma, coloração das colônias, consistência das colônias, forma e elevação de bordo, margem, além de teste de Gram, tolerância à salinidade, características celulares em microscópio óptico e proteínas totais por eletroforese em gel de poliácridamina. Os isolados apresentaram alta diversidade fenotípica cultural e surgiram isolados com características distintas das estirpes-tipo. Apesar de métodos moleculares serem considerados essenciais à identificação destas bactérias (Kirchhof et al., 1997; Nóbrega et al., 2004), estes resultados indicaram que características culturais podem ser aplicáveis em estudos exploratórios da diversidade destas bactérias em solos sob diferentes condições, reduzindo o número de isolados a serem submetidos a estudos detalhados e avançados em laboratórios mais equipados.

No estudo de Freitas & Melloni (2004), diferenças de diversidade fenotípica cultural foram também encontradas utilizando meios de cultura específicos para bactérias diazotróficas associativas, com valores de 15,8; 1,6 e 1,3 vezes superiores nas áreas não degradadas para *Azospirillum* spp. (meio NFB), *Herbaspirillum* spp. (meio JNFb) e *A. amazonense* (meio Fam), respectivamente, com perda de diversidade em áreas degradadas ao redor de 34%.

## 6. Microscopia Direta

O método de avaliação da diversidade por meio do isolamento e posterior caracterização sob microscopia direta é muito utilizado para fungos micorrízicos arbusculares (MAs). Características relacionadas ao tamanho do esporo, forma, coloração, ornamentação, número de paredes internas e externas e reação ao reagente de Melzer podem ser utilizados na identificação de tipos morfológicos presentes no solo. É um método simples, rápido, econômico e envolve equipamentos simples como microscópio óptico ou estereoscópico. Segundo Morton & Benny (1990), apesar de aparentemente simples, este método, quando envolve estudos de parede celular, permite a classificação de fungo MA por espécie.

Após a identificação de espécies de fungos MAs por características como cor, forma, tamanho, ornamentação e número de paredes de esporos, Melloni et al. (2003) calcularam a diversidade destes microrganismos em solos de diferentes áreas de mineração (Figura 4).

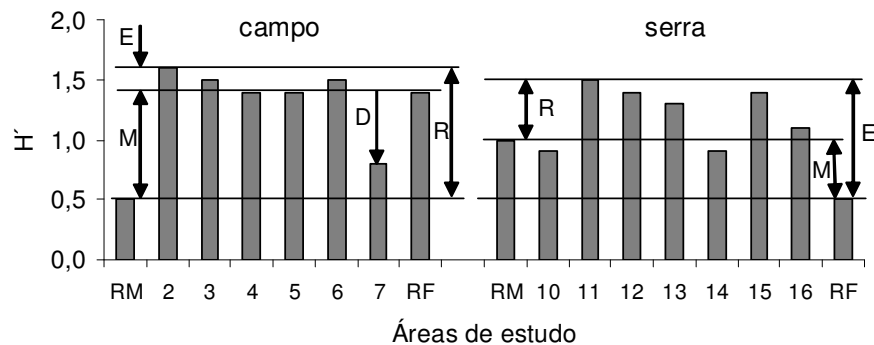
Por este estudo, verificou-se que a sensibilidade da diversidade de fungos MAs em indicar a reabilitação de solos minerados variou em função dos locais de estudo (campo e serra). No campo, foi sensível em indicar o efeito negativo da mineração (M) e positivo da reabilitação (R), com alguns valores superiores ao da referência (E). Na serra, obteve-se um comportamento diferente do valor M, já que a área recém-minerada apresentou diversidade de fungos MAs superior àquela da referência (Figura 4). Deve-se salientar que este resultado pode ter ocorrido em função do baixo número total de esporos obtidos nas amostras de solos recém-minerados, o qual influencia diretamente no valor final do índice de diversidade de Shannon-Weaver. Esta questão revela que a interpretação dos valores de diversidade de fungos MAs deve ser feita com ressalvas pois este atributo, avaliado isoladamente, pode levar a conclusões precipitadas e incorretas da qualidade do solo.

## 7. Perfis de Proteína Total, Plasmídeo, Análises de Fosfolipídeos e Ácidos Nucléicos

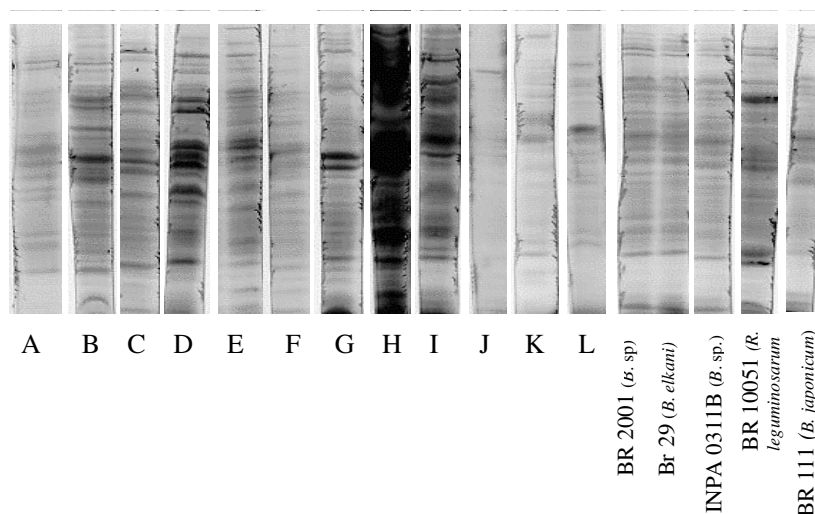
Apesar da extrema importância dos métodos moleculares nos estudos da diversidade microbiana em solos sob diferentes condições, apresentar-se-ão somente alguns resultados envolvendo tais metodologias, em função dos objetivos traçados para este capítulo. Para estudos aprofundados nesta área devem ser consultadas outras referências.



Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para separação e caracterização de proteínas totais, e uma destas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), é uma ferramenta confiável na sistemática microbiana e tem sido usada para separar estirpes e até espécies de bactérias importantes no solo, como rizóbio (de Bruijn et al., 1998). A eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas celulares pode produzir padrões de até trinta bandas e ser útil nos estudos de identificação, diversidade, taxonomia e ecologia de rizóbio. Moreira et al. (1993), por meio do perfil de proteínas totais de 171 isolados de rizóbio obtidos da Amazônia e Mata Atlântica, observaram maior diversidade entre os isolados de crescimento rápido do que os de crescimento lento. Dupuy et al. (1994) analisaram 84 isolados de *Bradyrhizobium* por SDS-PAGE e encontraram alta diversidade entre isolados obtidos na superfície e em profundidade no solo. Assim como Nóbrega et al. (2004), como já apresentado no item 4.2.1, obtiveram alta dissimilaridade de isolados de bactérias diazotróficas associativas em relação a estirpes-tipo, de acordo com os padrões eletroforéticos de proteína total, em solos de mineração de bauxita. Em diferentes sistemas de uso da terra (SUT) na Amazônia, Pereira (2000) obteve boa discriminação dos isolados de rizóbio pela técnica do perfil protéico. No entanto, não houve relação entre diversidade calculada por este método e a diversidade obtida por meio de características culturais e nem com os sistemas estudados, indicando que novos estudos fossem indicados para verificar o potencial de utilização deste atributo como bioindicador desses diferentes ecossistemas. Na Figura 5 está representado um perfil protéico de isolados de rizóbio de diferentes SUTs da Amazônia, o qual permite a discriminação destas bactérias em comparação com os padrões apresentados pelas estirpes-tipo. Por meio deste perfil, pode-se calcular o índice de diversidade correspondente e prosseguir com a análise comparativa das áreas de estudo.



**Figura 4.** Diversidade ( $H'$ ) de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de mineração de bauxita revegetadas com diferentes espécies vegetais e em diferentes idades. Campo: RM (recém-minerada), 2 (revegetada com braquiária e capim-gordura por 6 meses), 3 (eucalipto com 3 anos), 4 (capim-azevém com 4 anos), 5 (bracatinga e capim-gordura com 10 anos), 6 (eucalipto com 16 anos), 7 (bracatinga e capim-gordura com 19 anos) e RF (área-referência do campo, não minerada). Serra: RM (recém-minerada), 10 (revegetada com capim-gordura e feijão-guandu por 6 meses), 11 (braquiária e feijão-guandu por 2 anos), 12 (bracatinga e capim-gordura por 6 anos), 13 (espécies nativas com 10 anos), 14 (bracatinga com 14 anos), 15 (eucalipto 16 anos), 16 (bracatinga e outras espécies nativas com 18 anos) e RF (área-referência da serra, não-minerada). R (efeito positivo da reabilitação em relação à RM), M (efeito negativo da mineração em relação à RF), E (ganho-extra de diversidade pela reabilitação em relação à RF), D (déficit de diversidade em relação à RF).



**Figura 5.** Exemplo de perfis de proteína total de grupos fenotípicos culturais de isolados de rizóbio capturados por caupi e das estirpes-tipo BR 111, INPA 0311B, BR 10051, BR 2001 e BR 29. Fonte: Pereira (2000).

Outro método utilizado em estudos de diversidade genética bacteriana é o perfil de plasmídeos. Os perfis de plasmídeo é uma ferramenta muito útil e comumente utilizada em estudos de diversidade de *Rhizobium* e mostrou ter um poder discriminante semelhante às análises de restrição de DNA (Laguerre et al., 1992). Pela alteração no padrão de bandas de plasmídeos, podem-se estimar alterações nas populações e avaliar sua diversidade. O conhecimento da estrutura populacional de rizóbios indígenas no solo e como ela muda com o tempo e com as condições ambientais é importante em estudos dos efeitos ecológicos de práticas agrícolas e introduções de microrganismos geneticamente modificados. Handley et al. (1998) obtiveram alta correlação entre perfis de plasmídeos e após amplificação com *primers* randômicos (RAPD) nos estudos de diversidade de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* em solos cultivados ou não. Em solos contaminados por metais pesados (especialmente Zn e Hg) e outros não contaminados, Castro et al. (1997) avaliaram a diversidade genética de população natural de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* por este método e verificaram variação nos perfis e perda de plasmídeos em solos contaminados. Houve redução da capacidade de fixação de nitrogênio nos solos contaminados, sendo que somente 15% dos isolados do solo contaminado apresentaram capacidade de redução de acetileno, enquanto 94% dos isolados do solo não contaminado tiveram esta capacidade. Localizando os genes de resistência a metais pesados, no plasmídeo ou cromossomo, seria possível construir espécies de *Rhizobium* com este fenótipo, possibilitando o estabelecimento dessas bactérias em áreas contaminadas.

Muitos pesquisadores têm utilizado a análise de fosfolipídeo para avaliar o efeito de sistemas de manejo do solo (Zelles et al., 1992), de aplicações de lodo de esgoto (Dahlin et al., 1997), de contaminação por metais pesados (Baath et al., 1998), entre outros, nos microrganismos e/ou processos microbiológicos do solo. Os

fosfolipídeos são encontrados na membrana celular microbiana, podem ser facilmente extraídos e seu estudo fornece uma estimativa da estrutura da comunidade microbiana sem a necessidade de cultivo dos microrganismos (Hill et al., 2000).

A análise da estrutura da comunidade pela extração direta de DNA do solo é, talvez, o melhor método disponível para demonstrar como as perturbações podem afetar as populações e como a estrutura da população afetará a qualidade do solo. As técnicas para extração, apesar da exigência de laboratórios mais equipados, estão disponíveis (Picard et al., 1992), sendo que a heterogeneidade do DNA extraído pode refletir a diversidade da comunidade (Turco & Blume, 1999). Isto porque microrganismos não cultiváveis ou em baixa densidade no solo podem não ser detectados no DNA extraído (Pillai et al., 1991). A reação da polimerase em cadeia (PCR), a qual permite a amplificação de pequenas regiões específicas do DNA, pode ser utilizada com *primers* específicos de determinadas regiões ou com *primers* randômicos. Coutinho et al. (1999) avaliaram a diversidade de rizóbio em solos cultivados e não cultivados por meio de perfis de RAPD e mostraram, além da redução da diversidade com o cultivo, o potencial e a sensibilidade desta técnica em indicar o impacto do cultivo de solos nestas populações.

Nos últimos anos, técnicas baseadas na análise de genes do 16S rRNA em procariotos (Muyzer et al., 1993) e 5S ou 18S rRNA em eucariotos (Smit et al., 1999) têm sido amplamente utilizadas na detecção, identificação, classificação e filogenia de microrganismos. A amplificação direta por PCR do 16S rDNA de amostras ambientais tem possibilitado o estudo da diversidade microbiana sem o cultivo dos microrganismos (Giovannoni et al., 1990) e esta tem sido considerada a grande vantagem deste método (Hill et al., 2000). Os genes ribossomais se tornaram populares pelo fato de ocorrerem em todos os organismos, possuírem a mesma função em todos eles e apresentarem alto grau de conservação e grande número de cópias. O desenvolvimento da PCR e de técnicas de sequenciamento têm consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia e, atualmente, milhares de seqüências do 16S rRNA estão disponíveis em banco de dados. Avaliando a diversidade genética de rizóbio por padrões de restrição do 16S rDNA ou por Polimorfismo de fragmentos obtidos por enzimas de restrição-PCR/RFLP (Massol-Deya et al., 1995) em amostras de solo de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, Pereira (2000) verificou que este método foi menos discriminatório dos isolados de rizóbio que a análise fenotípica por padrão de proteína total e, portanto, não indicado nestes estudos de levantamento de diversidade. Portanto, independentemente das técnicas empregadas, os resultados sempre devem ser interpretados com ressalvas.

Procedimentos complementares têm sido atualmente utilizados para separar os produtos originados por PCR, e entre estes, destacam-se a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer et al., 1993) e de gradiente térmico (TGGE) (Smit et al., 1999). Estas técnicas permitem a separação de produtos de mesmo tamanho, mas com seqüências diferenciadas de nucleotídeos, originando perfis que se relacionam à comunidade microbiana do solo. No entanto, os produtos amplificados não necessariamente correspondem a uma determinada espécie, os métodos de extração variam quanto à eficiência e, comparado à bactéria, há poucos estudos envolvendo eucariotos, o que limitam as informações disponíveis (Hill et al., 2000).

Também, técnicas de hibridização *in situ* têm sido utilizadas, auxiliando a identificação e quantificação de grupos taxonômicos específicos ou gerais de microrganismos no ambiente (Amann et al., 1995; Kenzaka et al., 1998). As células são fixadas e regiões específicas do DNA como 16S ou 23S rRNA são hibridizadas com sondas oligonucleotídicas marcadas com compostos fluorescentes ou não, e avaliadas em microscópios devidamente equipados. Este método permite a detecção de microrganismos em vários níveis taxonômicos, não necessita de isolamento prévio, permite observação tridimensional do microrganismo no ambiente (Kirchhof et al., 1997) e garante quantificação com grande precisão. No entanto, para ser detectada, a célula microbiana deve ser metabolicamente ativa e estar em densidade suficiente para a hibridização. Segundo Hill et al. (2000), esta técnica é considerada poderosa ferramenta no estudo de dinâmica de populações, durante a recuperação de áreas degradadas ou biorremediação, podendo ser complementada com o cultivo em meios de cultura definidos (ver subitem 4.2.1).

### **Diversidade microbiana funcional**

A diversidade funcional compreende a diversidade das atividades microbianas no solo, sendo que a dinâmica da comunidade microbiana está diretamente relacionada ao funcionamento de um ecossistema antes ou após uma perturbação (Kennedy, 1999). O direcionamento da recuperação de um sistema impactado será determinado por grupos funcionais importantes. Como já apresentado, os microrganismos do solo constituem uma fonte e dreno de nutrientes em todos os ecossistemas e têm papel fundamental na decomposição da serapilheira e ciclagem de nutrientes, estrutura do solo, fixação biológica de N<sub>2</sub>, associações micorrízicas, controle biológico de fitopatógenos e outras alterações<sup>2</sup> nos atributos do solo que influenciam o crescimento vegetal (Kennedy & Smith, 1995). Tais microrganismos são um dos indicadores disponíveis mais sensíveis e a maioria é útil em classificar sistemas degradados ou contaminados, uma vez que a diversidade pode ser afetada rapidamente em função de estresses no ecossistema. No entanto, a utilização de microrganismos e sua funcionalidade para a avaliação de estresses ambientais e redução da diversidade biológica necessitam de estudos mais conclusivos.

A utilização de substrato é considerada a chave para a sobrevivência, crescimento e competitividade de microrganismos no solo. A grande faixa de compostos disponíveis ao metabolismo e as exigências específicas dos microrganismos fizeram com que se testasse a utilização de diferentes substratos como fator de discriminação e identificação de microrganismos. Os padrões de utilização de diferentes substratos como fontes de C são a base do sistema BIOLÓG (Zak et al., 1994; Heuer & Smalla, 1997). A capacidade dos microrganismos utilizarem ou não estes substratos pode revelar a estrutura da comunidade microbiana do solo e indicar a diversidade funcional destes microrganismos. Há algumas considerações quanto à utilização deste método para a análise da comunidade microbiana. Apesar de possibilitar o estudo da comunidade microbiana sem a obtenção de isolados e testar diferentes substratos de uma única vez, não se sabe, certamente, se a resposta à utilização do substrato é devido ao crescimento rápido de alguma espécie microbiana ou à elevada densidade de espécies adicionadas ao meio (Konopka et al., 1998). Este fato se deve à diluição da

amostra antes da inoculação nos respectivos meios. Segundo Hill et al (2000), a densidade do inóculo inicial, em termos de células metabolicamente ativas, deve ser padronizada, o que pode ser feito por meio de corantes vitais combinado com microscopia de epifluorescência. No entanto, os substratos encontrados comercialmente para utilização desta técnica não são importantes ecologicamente e a maioria não reflete a diversidade de substratos encontrados no ambiente (Konopka et al., 1998). A quantidade de dados, aliada à dificuldade de análise e interpretação dos resultados, podem ser consideradas outras desvantagens que devem ser consideradas. Por este método, Baath et al. (1998) avaliaram o efeito dos metais Cu, Ni e Zn na microbiota do solo e não observaram diferenças significativas na diversidade funcional, indicando que, apesar de poder haver alteração da composição de espécies no solo, a funcionalidade com relação ao metabolismo de fontes de C não foi alterada. Como todos os métodos biológicos apresentam muitas vantagens e deficiências, recomendando-se utilizá-lo juntamente com outros métodos no monitoramento da diversidade funcional de microrganismos do solo.

Outro método de se avaliar a qualidade do solo é pelo estudo da diversidade funcional ou funcionalidade de grupos microbianos específicos. A atividade de microrganismos como os diazotróficos e fungos micorrízicos arbusculares (MAs) apresentam grande potencialidade de utilização como indicadores da qualidade do solo em áreas degradadas (Visser & Parkinson, 1992; Turco et al., 1994), pela participação nos ciclos biogeoquímicos e incorporação de nitrogênio, otimização da utilização de nutrientes pelas plantas, contribuição ao processo de agregação do solo e sustentabilidade do solo (Siqueira et al., 1994; Franco & Faria, 1997; Smith & Read, 1997; Moreira & Siqueira, 2002). Apresentam alta sensibilidade a variações químicas, físicas e biológicas no solo, normalmente provocadas por atividades antropogênicas, além de altas correlações com as funções benéficas do solo (Brockwell et al., 1995; Kling & Jakobsen, 1998; Doran & Zeiss, 2000). Assim, a funcionalidade destes grupos microbianos afeta diretamente a qualidade e a fertilidade do solo e contribui para o funcionamento dos ecossistemas (Brookes, 1995).

Avaliando a reabilitação de solos de mineração por meio de atributos relacionados à nodulação de plantas-isca e propágulos de fungos MAs, Melloni et al. (2003 e 2006) verificaram, apesar da variação na sensibilidade, grande potencial de utilização do número e atividade de nódulos, micélio extrarradicular total e número de esporos de fungos MAs como indicadores microbiológicos da reabilitação. Caldas et al. (2004), comparando áreas degradadas e não degradadas, no sul de Minas Gerais, verificaram que o atributo número de esporos de fungos MAs foi considerado bom indicador, apesar do número nas áreas degradadas ser quase 2,5 vezes superior àquele obtido nas não degradadas, mostrando que muitos estresses ambientais podem estimular a esporulação de diferentes espécies de fungos MAs.

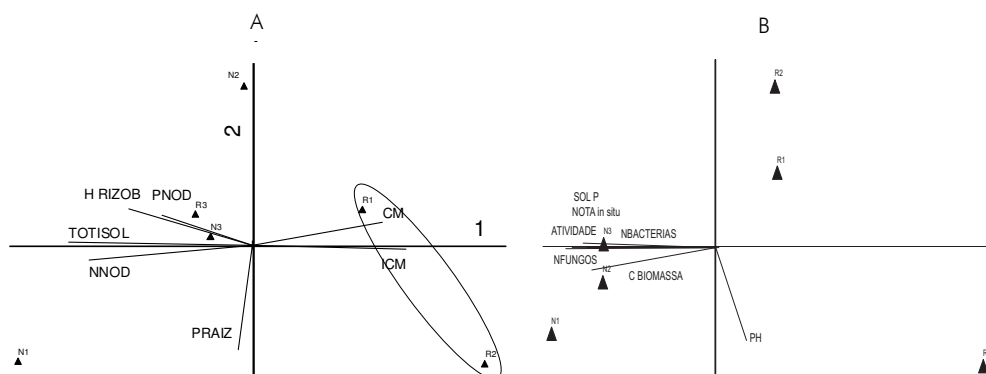
No entanto, Weissenhorn et al. (1995) não obtiveram correlação entre número de esporos desses fungos e exposição a doses crescentes de lodo de esgoto contaminados por metais pesados, mostrando que este atributo microbiológico não se comportou como um bom indicador. Em solos de mineração, atributos como atividade da nitrogenase, micélio extrarradicular ativo, colonização micorrízica, diversidade de fungos MAs e densidade de diazotróficos endofíticos não foram sensíveis em discriminar o efeito da reabilitação, e não foram recomendados como indicadores microbiológicos (Melloni et al., 2003 e 2006).

Análises de agrupamento e de componentes principais mostraram que as áreas revegetadas com bracatinga e gramíneas, em diferentes idades de reabilitação, apresentaram estado microbiológico mais próximo das áreas consideradas como referência. Assim, comparando-se valores microbiológicos ou bioquímicos de solos degradados com aqueles não degradados de uma mesma região (fixando os efeitos do relevo, material de origem e tipo de solo), pode-se estimar o déficit atual da funcionalidade de grupos microbianos de interesse e tomar as medidas necessárias para recuperar a função dos microrganismos do solo e contribuir para a sua sustentabilidade.

Caldas et al. (2004), em solos de áreas degradadas e não degradadas, verificaram que os atributos índice de colonização micorrízica (percentual de colonização por segmento de raiz) e porcentagem de colonização micorrízica (percentual total de colonização) não foram considerados bons indicadores de recuperação, visto a pouca variação encontrada entre as raízes coletadas *in situ* nessas áreas. Resultados semelhantes foram obtidos por Theodoro et al. (2003), comparando solos sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros pelo atributo microbiológico carbono da biomassa e colonização micorrízica.

A diversidade funcional também vem sendo estudada por métodos baseados em atividades enzimáticas específicas (â-glicosidase, urease, fosfatase alcalina e aril sulfatase), conforme trabalhos de Tabatabai (1994) e Carneiro (2000). A atividade enzimática do solo exerce um importante papel na sustentabilidade e funcionalidade do ecossistema pois é fundamental para catalisar inúmeras reações necessárias para a manutenção da atividade microbiana, decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes e formação de matéria orgânica do solo (Dick et al., 1996b). Carneiro (2000), estudando solos de mineração em diferentes estágios de recuperação, verificou que as atividades de â-glicosidase, fosfatase ácida, urease e hidrólise de diacetato de fluoresceína foram severamente afetadas pela mineração. No entanto, as mais sensíveis em discriminar as diferentes áreas foram a â-glicosidase e aquelas relacionadas à hidrólise do diacetato de fluoresceína.

É importante salientar que a quantificação microbiana da qualidade do solo gera muitos dados microbiológicos e bioquímicos, o que pode dificultar a interpretação dos reais resultados. Para evitar ou amenizar tais problemas, podem ser empregadas análises de agrupamento das áreas em dendrogramas de similaridade ou de componentes principais. Enquanto a primeira agrupa áreas similares do ponto de vista microbiológico ou bioquímico estudado, a última técnica é freqüentemente utilizada para reduzir o número de variáveis totais, tornando a análise dos dados mais eficiente e mantendo a maioria ou todas as informações originais. Exemplos destas metodologias podem ser obtidos em Melloni (2001), Caldas et al. (2004), Nascimento & Melloni (2005) e Silveira et al. (2006). Em todos esses trabalhos, áreas degradadas apresentaram baixa similaridade com aquelas não degradadas, do ponto de vista microbiológico e bioquímico, sendo as primeiras separadas espacialmente daquelas não degradadas, conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6.** Análise de componentes principais para: a) atributos avaliados: matéria seca da parte aérea de feijoeiro (MSPA), PRAIZ (peso de raízes frescas de feijoeiro), PNOD (peso de nódulos frescos), NNOD (número de nódulos por planta), TOTISOL (total de isolados de rizóbio), HRIZOB (índice de diversidade de rizóbio), CM (colonização micorrízica de feijoeiro), ICM (índice de colonização micorrízica de feijoeiro), ESPTOT (número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de solo in situ, de áreas degradadas (R1, R2 e R3) e não degradadas (N1, N2 e N3), em Itajubá/MG, no inverno); b) atributos microbiológicos: solubilizadores de fosfato (SOL-P), densidade de fungos (NFUNGOS), densidade de bactérias (NBACTERIAS) e bioquímicos (ATIVIDADE, C BIOMASSA), nas mesmas áreas. FONTE: Caldas et al. (2004) e Silveira et al. (2006).

## 8. Considerações Finais

Os efeitos de práticas agrícolas como cultivo, rotação de culturas, fertilização e irrigação em atributos físicos e químicos do solo são bem documentados. No entanto, pouco é estudado sobre as alterações na microbiota do solo, suas atividades bioquímicas e o impacto destas na produtividade e sustentabilidade de sistemas.

A atividade da microbiota do solo é largamente responsável pelas transformações de nutrientes nos solos e por um grande número de propriedades fundamentais como fertilidade e estrutura. Mudanças na atividade destes microrganismos podem ser um indicativo de, ou ser extremamente sensível a, mudanças na qualidade do solo. Deste modo, populações de microrganismos-chave do solo como os diazotróficos e fungos micorrízicos e, ou, processos bioquímicos mediados pela microbiota são bioindicadores sensíveis de mudanças na qualidade do solo e podem ser utilizados na predição de problemas ligados à degradação do solo e à redução da produtividade. A seleção de microrganismos ou grupos de microrganismos para utilizar como bioindicadores deve ser criteriosa, respeitar os recursos disponíveis e os objetivos específicos do programa de recuperação do solo degradado. Porém, estes indicadores da qualidade do solo devem ser utilizados em conjunto com outros atributos físicos e químicos, já que a funcionalidade e sustentabilidade dos diversos sistemas são governadas pela interação destes atributos.

Atualmente, pesquisa e divulgação são ainda necessárias para identificar e quantificar atributos físicos, químicos e biológicos com potencial de utilização como indicadores da qualidade do solo em áreas degradadas. O desenvolvimento e, ou, adaptação/simplificação de metodologias relacionadas à diversidade e, ou, seu papel na funcionalidade do solo, aliado ao número crescente de pesquisadores brasileiros dedicados a este estudo, certamente contribuirão à melhor utilização do sistema solo-planta e à redução do número de áreas degradadas.

## Referências

- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v.59, p.143-169, 1995.
- ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stresses. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society for Microbiology, 1984. p. 540-545.
- BAATH, E.; DÍAZ-RAVINA, M.; FROSTEGARD, A.; CAMPBELL, C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.238-245, Jan. 1998.
- BEARE, M.H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY Jr, D.A.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, v.170, p.5-22, 1995.
- BOSSIO, D.A.; SCOW, K.M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4043-4050, 1995.
- BROCK, K.D.; MADIGAN, M.T. Major microbial disease. In: BROCK, K.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganisms**. 6.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1991. p.556-557.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for imposing legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, v.174, n.1/2, p.143-180, July 1995.
- BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, p. 269-279. 1995.
- CALDAS, A.; MELLONI, R; MELLONI, E.G.P. Densidade de bactérias nodulíferas fixadoras de N<sub>2</sub> e de fungos micorrízicos arbusculares em área degradada, no sul de Minas Gerais. In: FERTIBIO, 2004. **Anais...** Lages, SC, 2004.
- CARDOSO, E.J.B.N.; FORTES NETO, P. Aplicação de lodo de esgoto e as alterações microbianas no solo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 14. **Anais...** Temuco, Chile, 1999.
- CARDOSO, E.J.B.N.; SERRANO, M.I.P. Evaluation of microbial indicators for sewage sludge amendment in a soil under reforestation. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2001. p.46.



CARNEIRO, M.A.C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosseqüências de reabilitação em áreas de mineração de bauxita**. Lavras: UFLA, 2000. 166p. (Tese - Solos e Nutrição de Plantas)

CASTRO, I.V.; FERREIRA, E.M.; MCGRATH, S.P. Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates in Portuguese soils polluted by industrial effluents. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1209-1213, 1997.

CHANDER, K.; BROOKES, P.C.; HARDING, S.A. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n.11, p.1409-1421, 1995.

CHUEIRE, L.M.O.; FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Effects of soil tillage management and crop rotation on bradyrhizobia population. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p. 551.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.159-167, 1999.

DAHLIN, S.; WITTER, E.; MARTENSSON, A.; TURNER, A.; BAATH, E. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels for metal contamination. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.9, p.1405-1415, 1997.

DARST, B.C.; DIBB, D.W. **Facts from our environment**. PPI/FAR, Norcross/Sackatoon, 1995. 59p.

DE BRUIJN, DAVEY, M.E.; McSPADDEN-GARDENER, B.; MILLCAMPS, A.; RADEMAKER, J.L.W.; RAGATZ, M.L.; SCHULTZ, P.; STRUFFI, P.; STOLTZFUS, J. Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic diversity and stress-induced gene expression in plant-associated diazotrophs. In: ELMERICH, C. et al. (eds.) **Biological nitrogen fixation for the 21st Century**. Netherlands: Kluwer, 1998. p.571-576.

DICK, R.P.; THOMAS, D.R.; HALVORSON, J.J. Standardized methods, sampling, and sample pretreatment. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) **Methods for assessing soil quality**. **Soil Science Society of America**, v.49, p.107-121, 1996a.

DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; TURCO, R.F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996b. p.247-272.

DORAN, J.W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M.A. Soil health and sustainability. **Advances in Agronomy**, v.56, p. 1-54. 1996.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v.15, n.1, p.3-11, Jan. 2000.

DRINKWATER, L.E.; CAMBARDELLA, C.A.; REEDER, J.D.; RICE, C.W. Potentially mineralizable nitrogen as an indicator of biologically active soil nitrogen. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) **Methods for assessing soil quality**. **Soil Science Society of America**, v.49, p.217-229, 1996.

DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of Bradyrhizobia nodulating the Leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.3, p.461-473, July 1994.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N -fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.897-903, May/June 1997.

FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.D.; CHUEIRE, L.M.D.; TAKEMURA, S.M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, n.5, p.627-637, May 2000.

FRECKMAN, D.W.; VIRGINIA, R.A. Low diversity Antarctic soil nematode communities: distribution and response to disturbance. **Ecology**, v.78, n.363-369, 1997.

FREITAS, M.C.R.; MELLONI, R. Bactérias diazotróficas endofíticas como bioindicadores da recuperação de solos de áreas degradadas. Itajubá, UNIVERSITAS - Centro Universitário de Itajubá, 2004. (Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas)

GARCIA, C.; HERNADES, T. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 171-177, 1997.

GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v.345, p. 60-63, 1990.

GLANZ, J.T. **Saving our soil: solutions for sustaining Earth's vital resource**. Boulder: Johnson Books, 1995.

GRAHAM, P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN, P.S. (ed.) **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.99-112.

HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J. & BERINGER, J.E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.241-249, 1998.

HARRIS, R.F.; BEZDICEK, D.F. Descriptive aspects os soil quality/health. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. Defining soil quality for a sustainable enviroment. **Soil Science Society of America**, v.35, p.23-35, 1994.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phylosphere. **Journal of Microbiology Methods**, v.30, n.1, p.49-61, 1997.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.25-36, 2000.

HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUSEK, L.; DOLEZAL, L.; HOLOUBEK, I.; AND-L, P.; ANSORGOVÁ, A.; ALY, S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. **Environment International**, v.28, n.8, p.771-778, 2003.

HOLLOWAY, J.D.; STORK, N.E. The dimensions of biodiversity: the use of invertebrates as indicators of human impact. In: HAWKSWORTH, D.L. (ed.) **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. Wallingford: CAB International, 1991. p. 37-63.

- JOHNSON, M.J.; LEE, K.; SCOW, K.M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, v.114, n.3/4, p.279-303, 2003.
- KANESHIRO, D.M.; MELLONI, R.; MELLONI, E.G.P. Efeito da textura do solo na biodegradação de combustíveis. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL (WIMA). **Anais...** Campinas: FEA/UNICAMP, 2005.
- KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F.; SCHUMAN, G.E. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). **Soil Science Society of America Journal**, v.61, n.1, p.4-10, Jan./Feb. 1997.
- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, n.1, p.65-76, 1999.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.50, n.3, p.243-348, May/June 1995.
- KENZAKA, T.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. rRNA targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. **Microbiology**, v.144, p.2085-2093, 1998.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.853-862, 1997.
- KLING, M.; JAKOBSEN, I. Arbuscular mycorrhiza in soil quality assessment. **Ambio**, v.27, n.1, p.29-34, Feb. 1998.
- KNOB, A.; NOGUEIRA, M.A.; LOVATO, G.M.; LIMA, D.S.; SCOARIS, D.; PINTO, F.G.G.S.; CAMARGO, F.R.S.P.; BATISTA, J.S.S.; MYIAUCHI, M.Y.H.; ANDRADE, G. Propriedades microbiológicas e bioquímicas em solo submetido a diferentes sistemas de uso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, **Anais...** Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.
- KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, v.35, p.103-115, 1998.
- LAGUERRE, G.; MAZURIER, S.I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in field populations. **FEMS Microbiological Ecology**, v.101, p.17-26, 1992.
- LAL, R. Basic concepts and global issues: soil quality and agricultural sustainability. In: LAL, R. (ed.) **Soil quality and agricultural sustainability**. Ann Arbor Science, Chelsea, 1998. p.3-12.
- LARSON, W.E.; PIERCE, F.J. The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (eds) **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science of America, 1994. p.37-51.
- LEE, K.E. The functional significance of biodiversity in soils. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15. **Anais...** Acapulco: International Society of Soil Science, 1994. p. 168-182.

LUPWAYI, N.Z.; RICE, W.A.; CLAYTON, G.W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1733-1741, 1998.

MASSOL-DEYA, A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, 3.3.2, p.1-8, 1995.

MELLONI, R.; ABRAHÃO, R.S.; MOREIRA, F.M.M.; FURTINI NETO, A.E. Impacto de resíduo siderúrgico na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. **Revista Árvore**, v.24, n.3, p.309-315, 2000.

MELLONI, R. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita. Lavras: UFLA, 2001. 173p. (Tese - Solos e Nutrição de Plantas)

MELLONI, R.; PEREIRA, E.G.; TRANNIN, I.C.B.; SANTOS, D.R. DOS; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.7-13, jan./fev. 2001a.

MELLONI, R.; SILVA, F.A.M.; MOREIRA, F.M.S.; FURTINI NETO, A.E; Pó de forno de aciaria elétrica na microbiota do solo e no crescimento de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1547-1554, dez. 2001b.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.267-276, 2003.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.1, p.85-93, 2004.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.

MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isolados de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1991. 160p. (Tese-Doutorado em Ciência do Solo).

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625p.

MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; LANGE, A.; MELLONI, R.; LIMA, A.S.; DIAS JÚNIOR, H.; SIQUEIRA, J.O. Biodiversidade de bactérias diazotróficas associativas em áreas contaminadas por metais pesados e áreas de mineração de bauxita. In: XXII Reunião Latinoamericana de Rizobiologia & I Reunião Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio, 2004, Seropédica, 2004.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.3, p.695-700, Mar. 1993.

NASCIMENTO, Y.D. dos S.; MELLONI, R. Avaliação da qualidade de solos por meio de atributos microbiológicos e bioquímicos – Estudo de caso de áreas pertencentes à UNIFEI, Itajubá/MG. Itajubá, UNIVERSITAS - Centro Universitário de Itajubá, 2005. 20p. (Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas)

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.2, p.269-279, 2004.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPOPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration between natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.115, p.237-247, 2006.

OLDEMAN, L.R. The global extent of soil degradation. In: GREENLAND, D.J. & SZABOLCS, I. (eds.) **Soil resilience and sustainable land use**. Wallingford: CAB International, 1994. p.99-118.

O'NEILL, R.V.; DEANGELES, D.L.; WAIDE, J.B.; ALLEN, T.F.H. **A hierarchical concept of ecosystems**. Princeton: Princeton University Press, 1986. 263p.

OYARZUM, P.J.; GERLAUGH, M.; ZADOKS, J.C. Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogens of peas. **Applied Soil Ecology**, v.10, p.151-169, 1998.

PANKHURST, C.E.; HAWKE, B.G.; MACDONALD, H.J.; KIRBY, C.A.; BUCKERFIELD, J.C.; MICHELSEN, P.; O'BRIEN, K.A.; GUPTA, V.V.S.R.; DOUBE, B.M. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.35, p.1015-1028, 1995.

PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. **Biological indicators of soil health**. Wallingford: CAB International, 1997.

PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbios de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. Lavras: UFLA, 2000. 93p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).

PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X.; SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2717-2722, Sept. 1992.

PILLAI, S.D.; JOSEPHSON, K.L.; BAILEY, R.L.; GERBA, C.P.; PEPPER, L.L. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.2283-2286, 1991.

ROSZAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Reviews**, v.51, p.365-379, 1987.

SAWADA, Y. Indices of microbial biomass and activity to assess minesite rehabilitation. . In: **Minerals Council of Australia Environmental Workshop. Minerals Council of Australia**: Canberra. p.223-236, 1996.

SCHWENKE, G.D.; MULLIGAN, D.R.; BELL, L.C. Soil stripping and replacement for the rehabilitation of bauxite-mined land at Weipa. I. Initial changes to soil matter and related parameters. **Australian Journal of Soil Research**, v.38, p.345-369, 2000.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; MELLONI, E.G.P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. **Revista Cerne**, Lavras, v.12, n.1, 48-55, 2006.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; ELSAS, J.D. van; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2614-2621, 1999.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1997. 605p.

SOARES, C.R.F.S; ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5, Belo Horizonte, Palestra, 2002. p.56-82.

SORHEIM, R.; TORSVIK, V.L.; GOKSOYR, J. Phenotypical divergence between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology**, v.17, p.181-192, 1989.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, v.114, n.3/4, p.143-144, 2003.

STABEN, M.L.; BEZDICEK, D.F.; SMITH, J.L.; FAUCI, M.F. Assessment of soil quality in conservation reserve program and wheat-fallow soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.61, n.1, p.124-130, Jan./Feb. 1997.

SZABOLCS, I. The concept of soil resilience. In: GREENLAND, D.J.; SZABOLCS, I. (eds) **Soil resilience and sustainable landuse**. CAB International, Wallingford, 1994. p.33-40.

TABATABAI, M.A. Soil enzyme. In: WEAVER, R.W. (org.) **Methods of soil analysis**. Madison: **Soil Science Society of America**, 1994. p.775-833.

TATE III, R.L.; KLEIN, D.A. (ed.). **Soil Reclamation Processes**: microbiological analyses and applications. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 1-33.

THEODORO, V.C.A.; ALVARENGA, M.I.N.; GUIMARÃES, R.J.; JÚNIOR, M.M. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.25, n.1, p.147-153, 2003.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787, 1990.

TURCO, R.F.; KENNEDY, A.C.; JAWSON, M.D. Microbial indicators os soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (eds.) Defining soil quality for a sustainable enviroment. **American Society of Agronomy**, v.35, p.73-90, 1994.

TURCO, R.F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.529-550.

VAN BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, v.15, n.1, p.13-24, Jan. 2000.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: **International Biological Programme Handbook n.15**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

VISSER, S.; PARKINSON, D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 7, n.1/2, p.33-37, 1992.

WEISSEHORN, L.; MENCH, M.; LEYVAL, C. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n.3, p.287-296, 1995.

WICK, B.; KÜHNE, R.F.; VLEK, P.L.G. Soil microbiological parameters as indicators of soil quality under improved fallow management systems in south-western Nigeria. **Plant and Soil**, 202:97-107, 1998.

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

ZELLES, L.; BAI, Q.Y.; BECK, T.; BEESE, F. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides of microbial biomass and community structure in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.317-323, 1992.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C; NEVES, M.C.P Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

# Capítulo 12

## Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados

Marco Antonio **NOGUEIRA** <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

As micorrizas têm grande importância ecológica, visto que essas associações constituem regra na natureza, enquanto que as plantas não micorrízicas, a exceção. A capacidade das plantas em estabelecer simbiose com fungos micorrízicos surgiu há cerca de 400 milhões de anos, quando iniciaram o processo de colonização do ambiente terrestre (Simon et al., 1993).

Desde a primeira publicação sobre a descrição de uma associação micorrízica por Frank em 1885, muitas pesquisas investigaram seu papel no contexto ecológico e fisiológico das plantas. Embora a maioria dos trabalhos enfoque a absorção de nutrientes, há grande interesse no papel das micorrizas sobre o aumento da habilidade das plantas se estabelecerem em ambientes naturais ou naqueles alterados pela ação antrópica (Reid, 1990). Francis & Read (1994) destacam a importância da presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) sobre a estrutura e sucessão de comunidades vegetais em decorrência do seu grau de micotrofismo, isto é, sua dependência micorrízica. Além disso, é importante avaliar quais os efeitos da atividade humana sobre a comunidade de fungos micorrízicos nos habitats alterados, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Nesse último caso, os FMAs podem ser utilizados como indicadores dos efeitos da alteração do ambiente causada pelo homem (Leyval et al., 1997).

As maneiras pelas quais os metais atingem o solo são as mais variadas, indo desde sua ocorrência natural no material de origem, até sua introdução via atividade agrícola, mineração, indústrias ou atividade urbana (Alloway, 1995).

O uso de fontes alternativas de micronutrientes, como lodos de tratamentos biológicos, composto de lixo urbano e alguns resíduos industriais, pode contribuir para a disseminação de metais indesejáveis ou mesmo de micronutrientes em doses excessivas (Rodella & Alcarde, 2001).

---

<sup>(1)</sup> Professor - Universidade Estadual de Londrina; CCB/Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana. CP 6001, CEP - 86051-990, Londrina, PR. E-mail: [nogueira@uel.br](mailto:nogueira@uel.br)



Há dois aspectos a serem considerados nas interações entre FMA e metais: o primeiro diz respeito aos efeitos dos metais sobre a comunidade de FMAs e sua tolerância; o segundo, aos efeitos dos FMAs sobre a disponibilidade e transferência de metais a seus hospedeiros (Leyval et al., 1997). Resultados de pesquisas indicam que a presença dos FMAs em ambientes contaminados por metais pode levar à atenuação dos sintomas de toxicidade ou mesmo reduzir sua absorção excessiva pelas plantas. Assim, os fungos micorrízicos podem auxiliar no estabelecimento de plantas num ambiente desfavorável, abrindo as perspectivas de seu emprego na recuperação de áreas degradadas e contaminadas por metais em programas de fitorremediação ou fitoestabilização.

## 2. Efeito dos Metais Sobre os Fungos Micorrízicos

Os metais no solo podem estar presentes como íons livres, complexos metálicos solúveis, trocáveis no complexo coloidal, ligados à matéria orgânica, precipitados ou insolúveis na forma de óxidos, carbonatos e hidróxidos, ou ainda fazendo parte da estrutura dos minerais primários e secundários (Alloway, 1995). A toxicidade dos metais depende de sua biodisponibilidade, definida como a capacidade de serem transferidos de um desses compartimentos do solo para um organismo vivo (Leyval et al., 1997). No caso dos FMAs, um efeito direto do excesso de metais é a inibição da germinação dos esporos e do desenvolvimento inicial das hifas fúngicas, o que pode atrasar ou suprimir a formação da micorriza (Koomen et al., 1990; Del Val et al., 1999a). Andrade et al. (2004) encontraram efeito inibidor do Pb sobre a colonização radicular de soja e produção de esporos por *Glomus macrocarpum*. A colonização radicular reduziu de cerca de 35 para 20 %, enquanto que a produção de esporos foi inibida em 70% quando se adicionaram 600 mg dm<sup>-3</sup> de Pb.

Plantas, assim como microrganismos, podem adquirir resistência a metais por meio de mecanismos de exclusão pela restrição da absorção, ou ainda por mecanismos de tolerância, quando o organismo sobrevive na presença de altas concentrações internas do metal (Baker, 1987). O mecanismo de exclusão envolve a redução da absorção ou aumento do efluxo, formação de complexos extracelulares e liberação de ácidos orgânicos. Já no mecanismo de tolerância, os metais são quelados intracelularmente por meio de síntese de ligantes como metalotioneínas, polifosfatos e/ou compartimentalização nos vacúolos (Turnau et al., 1993; Leyval et al., 1997).

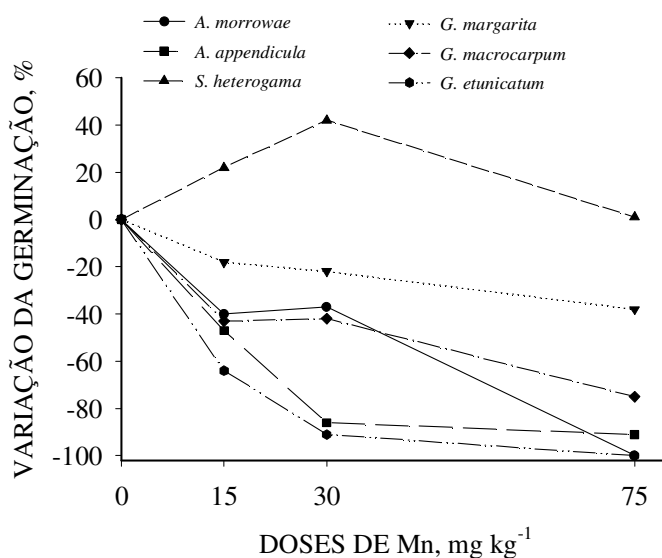
Um dos fatores edáficos que mais afetam a disponibilidade de metais no solo é o pH (Alloway, 1995). Valores de pH menores que 5 estão associados ao aumento da disponibilidade de muitos metais, o que pode resultar em efeitos deletérios tanto para o FMA quanto para seu hospedeiro. Avaliando o efeito do Pb sobre a colonização micorrízica em soja sob duas condições de pH (5,4 e 6,5), Andrade et al. (2003) observaram que a adição desse metal até 300 mg dm<sup>-3</sup> somente teve efeito deletério sobre a colonização micorrízica no menor valor de pH, o que foi atribuído à maior disponibilidade do metal nessa condição. Entretanto, o sucesso do estabelecimento de plantas em solos ácidos varia com o isolado de FMA a ela associado e com o pH do solo, o que indica a adaptação dos isolados de FMA às diferentes condições

edáficas. Extensa revisão sobre efeitos do pH sobre FMAs e seus hospedeiros é apresentada por Clark (1997).

Os mecanismos de tolerância a metais pelos FMAs não foram ainda elucidados (Leyval et al., 1997), porém tem sido observado que isolados provenientes de sítios contaminados por metais são mais resistentes quando expostos à mesma situação (Weissenhorn et al., 1993; 1994; Del Val et al., 1999a; Tullio et al., 2003; Malcová et al., 2003). Tullio et al. (2003) observaram que a pré-exposição de um isolado de fungo micorrízico arbuscular ao Cd fez com que este atingisse maiores níveis de colonização radicular e esporulação quando exposto novamente ao Cd. Por outro lado, quando um isolado de *Glomus*, proveniente de sítio contaminado por Mn, foi multiplicado em solo não contaminado, o fungo micorrízico apresentou menor tolerância ao excesso do metal num cultivo subsequente (Malcová et al., 2003). Uma observação interessante é o fato de que a tolerância de FMA a metais em alguns casos não é metal-específica. Por exemplo, esporos provenientes de locais contaminados por Cd apresentaram tolerância quando expostos a altas concentrações de Zn, mas o mesmo não ocorreu quando esporos isolados de local contaminado por Zn foram expostos a Cd (Weissenhorn et al., 1994). Assim, FMA isolados em diferentes solos diferem quanto a sua susceptibilidade ao excesso de metais por mecanismos de tolerância específicos e não específicos, adquiridos nas situações de exposição ao metal ao qual foi submetido. Esse comportamento foi primeiramente relatado por Gildon & Tinker (1983), embora os autores não tenham avaliado o efeito direto dos metais sobre os esporos, mas apenas sobre a capacidade dos FMAs colonizarem seus hospedeiros. Esses autores comprovaram ainda, por um aparato que permitiu fornecimento de excesso de Zn apenas à metade do sistema radicular, que a concentração excessiva de Zn nas raízes do hospedeiro foi o fator limitante da colonização pelo FMA, visto que a outra metade das raízes que não recebeu Zn também teve sua colonização severamente diminuída. Joner & Leyval (1997) denominaram o micélio externo do FMA de “a parte robusta da simbiose”, uma vez que o aumento da concentração de Cd no substrato foi menos limitante ao desenvolvimento do micélio externo do que ao desenvolvimento interno às raízes. É preciso salientar que o micélio que se desenvolveu no solo contaminado foi originário de esporos localizados num compartimento contendo solo sem adição de Cd, portanto sem o possível efeito sobre a germinação e crescimento dos mesmos. De modo contrário, Andrade et al. (2005) observaram que a adição de Cd à solução de cultivo não alterou os níveis de colonização radicular, mas causou diminuição do micélio externo em cerca de 25%.

Os efeitos da exposição a metais sobre os fungos micorrízicos variam com o metal. Em solo contaminado por Zn e Cd, plantas de *Agrostis capillaris* apresentaram colonização micorrízica da ordem de 40%, enquanto que em solo contaminado por Cu, a colonização das raízes foi quase ausente, o que sugere maior efeito fungicida do Cu (Griffioen et al., 1994). Weissenhorn et al. (1995) também observaram índices de colonização radicular de plantas de milho da ordem de 40% em solos cuja concentração de Cd, Zn e Pb estavam acima do limite aceitável pela Comunidade Européia. Não houve correlação entre os teores de metais no solo e na planta com a porcentagem de colonização micorrízica e nem com o número de esporos, o que sugere que a comunidade nativa de FMAs estava adaptada àquela situação.

No entanto, o número de esporos e a riqueza de espécies de FMA correlacionaram-se negativamente com o aumento da disponibilidade de Zn e Cu em um solo que recebeu resíduo da mineração de Zn em Minas Gerais (Klauber-Filho et al., 2002). Nesse caso, houve dominância de espécies, principalmente dos gêneros *Acaulospora* e *Scutellospora*, supostamente mais adaptadas ao excesso de metais. Da mesma forma, Del Val et al. (1999b) também observaram que, enquanto algumas espécies de FMA quase desapareceram com o aumento da poluição do solo por Zn e Cd, outras se mantiveram, mas, a níveis intermediários de poluição, a diversidade de espécies aumentou. Segundo os autores, esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que alguns ecotipos mais susceptíveis ao excesso de metais passam a ser substituídos por outros mais tolerantes, mas menos competitivos nas condições em que não há excesso.



**Figura 1.** Variação percentual da germinação dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares de acordo com doses de Mn adicionadas ao substrato, em relação ao tratamento sem adição de Mn (Fonte: Cardoso et al., 2002).

As diferentes espécies de FMA não são afetadas igualmente pela presença de metais (Del Val et al., 1999a). No caso específico do Mn, enquanto a germinação dos esporos de algumas espécies é drasticamente inibida, a de outras pode ser estimulada, dentro de certos limites (Cardoso et al., 2002) (Figura 1). Bartolome-Esteban & Schenck (1994) observaram comportamento semelhante quanto à germinação de esporos dos gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Glomus*, ou seja, pouca sensibilidade dos dois primeiros gêneros e forte inibição do último, quando expostos a solos com saturações crescentes de alumínio. Entretanto, houve variação interespecífica, com maior ou menor susceptibilidade de cada espécie ao alumínio, como no caso da espécie *Glomus manihotis*, que, mesmo sob alta saturação de Al, apresentou altos níveis de germinação dos esporos. Os autores sugerem que a tolerância ao alumínio pode ser um importante fator a ser considerado na seleção de FMAs a

serem utilizados em solos ácidos. É preciso ressaltar que o fato de os esporos apresentarem tolerância a metais em condições axênicas, não reflete necessariamente o que pode ocorrer nas condições naturais (Malcová et al., 2003), frente à complexidade de fatores que influenciam no processo de germinação dos esporos, crescimento micelial e eficiência da interação. Por exemplo, algumas bactérias do solo podem estimular a germinação dos esporos e o crescimento do micélio externo (Alten et al., 1993) ou ainda complexar metais (Scot & Palmer, 1990), mitigando o efeito adverso sobre os FMAs e seus hospedeiros. Os exsudatos radiculares também podem ter papel protetor contra o excesso de metais sobre fungos micorrízicos. Malcová & Gryndler (2003) encontraram efeito inibitório de Cd e Mn sobre o crescimento de hifas de fungos micorrízicos, mas esse efeito foi suprimido na presença de exsudatos provenientes de raízes de milho. Os autores atribuíram esse fato à quelatação dos metais pelos compostos orgânicos presentes nos exsudatos.

### **3. Mecanismos Envolvidos na Atenuação da Toxicidade de Metais a Plantas Micorrizadas**

Embora a maioria das plantas seja micotrófica, muitos dos relatos na literatura sobre a tolerância de plantas a metais são baseados em experimentos realizados em solução nutritiva, portanto sem micorrização, e, quando são realizados a campo, não consideram o endófito como um fator de contribuição (Bethlenfalvay & Franson, 1989).

Os efeitos dos FMAs sobre a atenuação da toxicidade causada pelo excesso de metais em plantas nem sempre são claros. Sob alta disponibilidade, alguns resultados indicaram que houve redução da concentração de metais na parte aérea de plantas micorrizadas (Díaz et al., 1996; Weissenhorn et al., 1995), enquanto que outros indicaram o contrário (Killham & Firestone, 1983; Weissenhorn & Leyval, 1995; Guo et al., 1996). Weissenhorn et al. (1995) observaram que a micorrização resultou em aumento da biomassa das plantas de milho e diminuição nos teores de Cd, Cu, Zn e Mn na parte aérea e raízes. Já Dehn & Schüepp (1989) observaram diminuição nos teores de Cd e Zn na parte aérea de plantas de alface micorrizada cultivadas sob altos níveis desses metais, mas houve aumento da concentração nas raízes, sugerindo a retenção do excesso desses metais nessa região. De fato, Guo et al. (1996) encontraram maior concentração de Cd nas raízes de plantas micorrizadas, mas esse efeito nem sempre resultou em proteção da parte aérea contra o excesso do metal. No entanto, o Ni foi, em alguns casos, diminuído na parte aérea e aumentado nas raízes. Maior acúmulo de Cd em raízes de plantas micorrizadas também foi observado por Carneiro et al. (2001) e Andrade et al. (2005). Nesse último caso, os autores observaram que os efeitos sobre o acúmulo de Cd nas raízes dependeram da espécie do fungo micorrízico. Joner & Leyval (1997) concluíram que o micélio externo do FMA pode transportar Cd do solo para as raízes, mas a transferência para a parte aérea foi restringida, fato atribuído à imobilização do metal pela biomassa fúngica nas raízes. Trindade et al. (1996) também observaram que a micorrização de plantas de milho adubadas com composto de lixo urbano contendo metais pesados levou à menor absorção de Mn e Cd.

A presença de micorriza reduziu as concentrações de Zn, Cd e Mn quando a concentração desses metais no solo era alta, e aumentou quando as plantas micorrizadas foram cultivadas em condições de baixa disponibilidade, concluindo-se que a maior ou menor absorção de metais pelas plantas micorrizadas depende dos teores disponíveis inicialmente (Heggo et al., 1990). Resultado semelhante foi observado por Dehn & Schüepp (1989) com relação ao Zn. Díaz et al. (1996) observaram efeito parecido, mas que nem sempre se repetiu, visto que o funcionamento da simbiose no que se refere à proteção do hospedeiro contra excesso de metais pelos FMAs depende, dentre outros fatores, da interação fungo-planta e da interação desses com o ambiente (Nogueira & Cardoso, 2003). Sob esse aspecto, Weissenhorn & Leyval (1995) afirmam que a interação entre FMA, planta e metal depende da combinação de fatores que influenciam o desenvolvimento do hospedeiro e do endófito e a disponibilidade do metal. Além disso, fatores indiretos relacionados ao crescimento da planta, como o balanço entre a nutrição por P e o dreno de C que o fungo exerce sobre seu hospedeiro, podem direcionar o resultado da simbiose (Hildebrandt et al., 1999), podendo, inclusive, agravar os efeitos negativos (Medeiros et al., 1995; Nogueira & Cardoso, 2003).

Outro aspecto importante é a origem do FMA em estudo. Houve maior eficiência micorrízica em promover o crescimento das plantas cultivadas sob alta disponibilidade de metais quando o FMA foi isolado de locais contaminados por metais (Gildon & Tinker, 1983; Shetty et al., 1995; Díaz et al., 1996; Guo et al., 1996; Hildebrandt et al., 1999). Nos trabalhos de Shetty et al. (1994; 1995), entretanto, o inóculo de FMA considerado resistente a metais, isolado de local contaminado, diferiu quantitativa e qualitativamente quanto à ocorrência de espécies de FMA no inóculo- controle, proveniente de local não contaminado. Isso pode comprometer a interpretação dos resultados. Dessa forma, nesse tipo de estudo, é importante que se utilizem inóculos equivalentes, com a única diferença entre eles o fato de terem sido produzidos na presença (ou excesso) e na ausência de um determinado metal pesado.

Conforme Leyval et al. (1997), o uso de propágulos de FMA não originários de locais contaminados por metais limita a interpretação dos resultados sobre os efeitos do excesso de metais sobre a planta micorrizada e o próprio endófito. A falta de resposta à micorrização por mudas de espécies arbóreas à medida que se aumentou a proporção de solo contaminado por Zn e Cd nos experimentos de Siqueira et al. (1999b) pode estar relacionada ao fato de que esses autores utilizaram propágulos de FMA provenientes de vaso de multiplicação, não expostos previamente à condição de excesso de metais. Ainda assim, as plantas micorrizadas, em condições de menor contaminação do solo por metais, foram favorecidas quanto ao seu crescimento, já que, em geral, apresentaram menores teores desses metais na parte aérea. Em outro trabalho, Siqueira et al. (1999a) observaram que a aplicação de formononetina, estimulante da colonização micorrízica, favoreceu a absorção de Fe e diminuiu a absorção de Zn por plantas de milho, sugerindo que esse pode ser um mecanismo pelo qual essa substância propiciou atenuação da toxicidade de Zn. Zn e Fe apresentam relações antagônicas entre si (Alloway, 1995) e, nesse caso, a maior micorrização, estimulada pela formononetina, pode ter aumentado a absorção de Fe pelas plantas (Caris et al., 1998) em detrimento à de Zn. Não houve efeito dessa substância sobre a absorção de Cd pelas plantas.

A presença do FMA pode funcionar como um atenuador dos efeitos da disponibilidade de metais tanto em altos quanto em baixos teores (Leyval et al., 1997), como no caso do Mn, Fe, Zn e Cu, os quais são nutrientes de plantas, mas que em excesso podem levar à toxicidade. O fato de que, em alguns casos, certos metais têm sua absorção aumentada, enquanto que em outros, diminuída, sugere que o efeito dos FMAs sobre a absorção de metais pesados pelas plantas é metal-específico e dependente da concentração no solo (Kaldorf et al., 1999).

Os mecanismos de tolerância das plantas a metais foram discutidos por Marschner (1995), e incluem ligações à parede celular, aumento do efluxo e/ou redução do influxo, compartimentalização nos vacúolos e quelação no citoplasma. Esses mecanismos podem ser comparáveis aos mecanismos microbianos de tolerância (Leyval et al., 1997). Existem várias diferenças entre plantas no que se refere à capacidade de acúmulo de metais pesados (Brooks et al., 1998). Algumas espécies, ou mesmo variedades dentro da mesma espécie, apresentam fitoquelantes, que podem reter os metais em excesso no citoplasma. Tal fato pode explicar alguns resultados controversos quanto à presença de micorriza (Leyval et al., 1997), visto que maiores níveis dessas substâncias são encontrados em plantas com maior tolerância a metais pesados (Brooks et al., 1998). A dependência micorrízica da espécie estudada também pode estar relacionada com os efeitos da micorrização sobre a resistência das plantas ao excesso de metais. Plantas micotróficas retiveram mais Zn no sistema radicular que as micotróficas facultativas, o que pode contribuir para explicar resultados inconsistentes quanto à alteração da translocação de metais em plantas micorrizadas (Shetty et al., 1994).

A maior tolerância a Zn e Pb das plantas estudadas por Díaz et al. (1996) foi parcialmente atribuída à maior absorção de P pelas plantas micorrizadas. Enquanto uma espécie de FMA propiciou maior crescimento das plantas sob excesso de Pb e Zn, por diminuir suas concentrações e aumentar as de P na parte aérea, a outra propiciou maior absorção de P, mas também de Pb e Zn. Mesmo assim, houve efeito positivo sobre o crescimento das plantas. O aumento da relação P/Zn pela maior absorção de P nas plantas micorrizadas também foi observado por Shetty et al. (1995), o que propiciou maior crescimento das plantas, resultado da maior tolerância ao excesso de Zn. De forma semelhante, Andrade et al. (2004) observaram que a adição de até 300 mg dm<sup>-3</sup> de Pb ao solo cultivado com soja causou efeito negativo à produção de biomassa das plantas micorrizadas. Esse efeito foi atribuído ao fato de que o metal foi mais prejudicial ao FMA associado, o que impediu que a planta se beneficiasse da simbiose à medida que as doses do metal aumentaram. Mesmo assim, as plantas micorrizadas tiveram maior produção de biomassa que as não micorrizadas, o que foi atribuído à melhoria de seu estado nutricional com relação ao P. Em outro trabalho, Andrade et al. (2005) observaram atenuação da toxicidade de Cd em feijão-de-porco na maior dose de P fornecida em hidroponia, sugerindo que o P pode atuar como um tampão quanto aos efeitos adversos do Cd. Como um dos principais efeitos da micorriza arbuscular é o aumento da absorção de P pelas plantas, esse pode ser um dos mecanismos pelos quais a toxicidade por metais pode ser atenuada em plantas micorrizadas. De fato, a toxicidade de Mn foi diminuída tanto em plantas de soja micorrizada quanto em plantas não micorrizadas que receberam dose extra de P (Nogueira et al., 2004). Apesar disso, as concentrações de Mn diminuiram apenas nas plantas micorrizadas, sugerindo que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na atenuação da toxicidade por esse metal.

Apesar de os mecanismos de proteção a metais não estarem elucidados, Galli et al. (1994) sugeriram que pode haver retenção de metais pesados no micélio dos FMAs por meio de adsorção à parede celular, bem como a fixação em grânulos de polifosfato. Dessa forma, a abundância do micélio externo produzido pelo FMA pode ser importante na sua habilidade em proteger a planta contra o excesso de metais (Díaz et al., 1996). A diminuição da translocação de Cd da raiz para a parte aérea das plantas micorrizadas, constatada pelo aumento da relação raiz/parte aérea quanto à concentração de Cd, sugere uma barreira no transporte desse metal atribuível à retenção interna dos cátions metálicos pelo micélio fúngico (Joner & Leyval, 1997). Kaldorf et al. (1999) constataram que o micélio de FMA colonizando raízes de milho sob excesso de metais continha maior concentração de metais do que as células do córtex da planta, sugerindo maior afinidade pelas hifas fúngicas, as quais funcionam como um “filtro” do excesso de metais. Esses resultados coincidem com outro estudo de localização de metal no interior de raízes micorrizadas de *Pteridium aquilinum*, que demonstrou o acúmulo de metais pesados dentro das hifas internas, principalmente em materiais ricos em fosfato no interior dos vacúolos (Turnal et al., 1993). O P pode afetar diretamente a desintoxicação por Zn nas plantas pelo seqüestro do Zn pelo ácido fítico (van Stevenink et al., 1987) ou ainda indiretamente por propiciar energia metabólica (ATP) para a compartimentalização do Zn nos vacúolos (Davies et al., 1991). Estudo recente também demonstrou que a glomalina, uma glicoproteína produzida pelos fungos micorrízicos, tem ação quelante sobre metais, diminuindo sua disponibilidade (Gonzalez-Chavez et al., 2004).

Joner et al. (2000) demonstraram que o micélio externo de FMA tem alta capacidade de adsorver metais devido à sua alta CTC e que, nesse caso, o micélio extraído de um isolado tolerante a metais teve maior capacidade de adsorção em comparação ao micélio proveniente de um isolado de FMA não adaptado às condições de alta disponibilidade de metais. O micélio externo de FMA também tem alta capacidade de adsorção de Cu (até  $14 \text{ mg g}^{-1}$  de micélio seco) (Gonzalez-Chavez et al., 2002). Entretanto, essa característica não teve relação com a origem dos FMAs quanto à contaminação por Cu, mas variou com a espécie do endófito. Resultados semelhantes foram relatados por Chen et al. (2001), que observaram maior concentração de Cu e Zn no micélio externo dos FMAs quando comparada à dos tecidos da parte aérea e raízes das plantas. Segundo Leyval et al. (1997), deve-se dar mais atenção ao micélio externo dos FMAs. Seus efeitos quanto aos mecanismos de atenuação da toxicidade de metais em plantas não parecem estar restritos apenas a mecanismos de adsorção eletrostática à parede celular dos fungos, mas também a mecanismos relacionados à absorção pelas hifas e transporte para o hospedeiro, dependentes do metabolismo celular. Zhu et al. (2001) sugeriram que a menor concentração de Zn encontrada em plantas micorrizadas cultivadas em solo com excesso desse metal foi devida à supressão de genes da planta que controlam a absorção de Zn, mediada pela presença do FMA. No entanto, Repetto et al. (2003) observaram que a micorriza modula a expressão de genes responsáveis por proteínas relacionadas ao estresse de Cd em ervilha, como a indução de proteínas transmembrânicas envolvidas na compartimentalização do Cd nos vacúolos.

Embora os isolados de FMA possam diferir quanto a sua capacidade de absorver e transportar metais pesados para seus hospedeiros, principalmente aqueles provenientes de locais contaminados (Guo et al., 1996; Hildebrandt et al., 1999), alguns resultados indicaram que nem sempre esses isolados são eficientes em proteger seus hospedeiros (Shetty et al., 1994; Weissenhorn et al., 1995; Weissenhorn & Leyval, 1995). Hildebrandt et al. (1999) atribuem essas diferenças ao fato de que os experimentos são realizados em condições distintas e que as plantas são avaliadas em diversas fases de desenvolvimento, às vezes precoces demais para a planta auferir os benefícios da simbiose micorrízica (Nogueira et al., 2004). Outra hipótese, no caso de espécies perenes, é que as plantas sofrem variações sazonais quanto à colonização radicular (Ietswaarts et al., 1992), o que pode alterar suas respostas à micorrização.

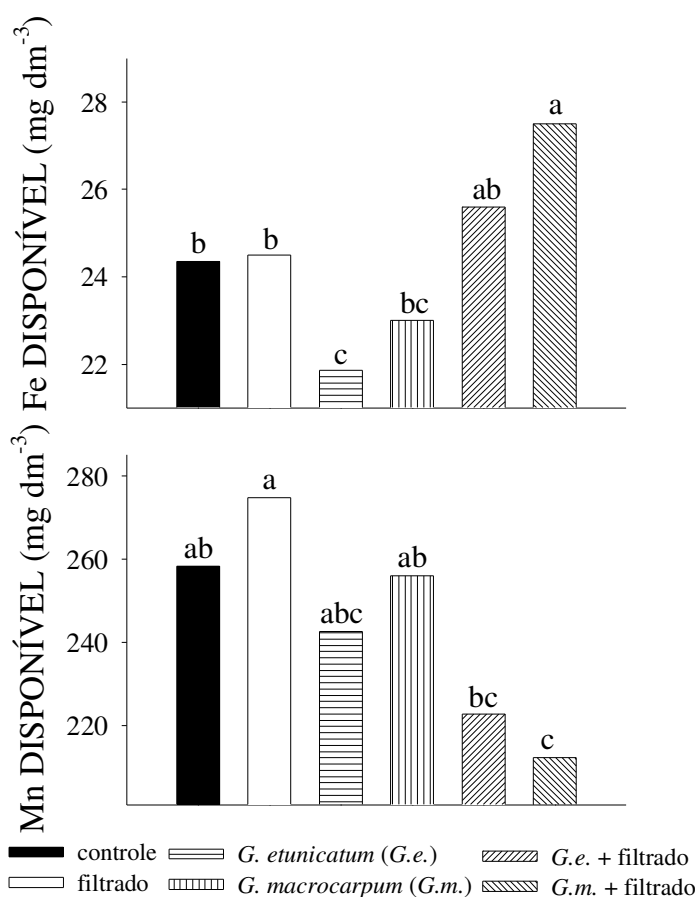
A maior retenção de Zn e Cd nas raízes de plantas de alface micorrizadas observada por Dehn & Schüepp (1989) foi atribuída à complexação desses metais por metalotioneínas, que apresentam grupos SH, como a cisteína, constatada apenas nas raízes das plantas micorrizadas. Tais proteínas são conhecidas por regular a concentração interna de metais, atenuando o excesso, por complexá-los nos grupos tióis da cisteína. Galli et al. (1995) encontraram maior produção dessas proteínas em plantas micorrizadas, mas não comprovaram seu envolvimento na proteção da planta contra o excesso de Cu. As fitoquelatinas também são proteínas ricas em grupos tiólicos, com afinidade por metais (Khan et al., 2000). Aparentemente, as metalotioneínas complexam os metais no citoplasma, enquanto as fitoquelatinas o fazem no processo de compartimentalização vacuolar do metal (Lee et al., 2004). Em plantas micorrizadas, melhor nutridas, a produção de fitoquelatinas pode ser aumentada, resultando num efeito indireto da presença de FMA sobre a tolerância a metais (Dehn & Schüepp, 1989). Além disso, simbioses como os FMAs podem alterar os padrões de exsudação radicular de ácidos e quelantes orgânicos, o que pode se refletir na disponibilidade de metais na rizosfera (Khan et al., 2000).

Outro aspecto, relacionado ao efeito da micorriza na diminuição da absorção de metais por plantas, diz respeito às alterações na comunidade microbiana da (mico)rizosfera. Sabe-se que a presença de micorriza altera quantitativa e qualitativamente a comunidade microbiana (Olsson et al., 1988; Lindermann, 1988). A produção de polissacarídeos extracelulares, os quais têm capacidade de adsorver metais em seus grupos negativamente carregados, encontrada em grande número de microrganismos e raízes (Scot & Palmer, 1990), pode ser favorecida pela presença de micorriza (Weissenhorn et al., 1994). Dessa forma, o metal adsorvido fica impedido de ser absorvido em excesso pela planta.

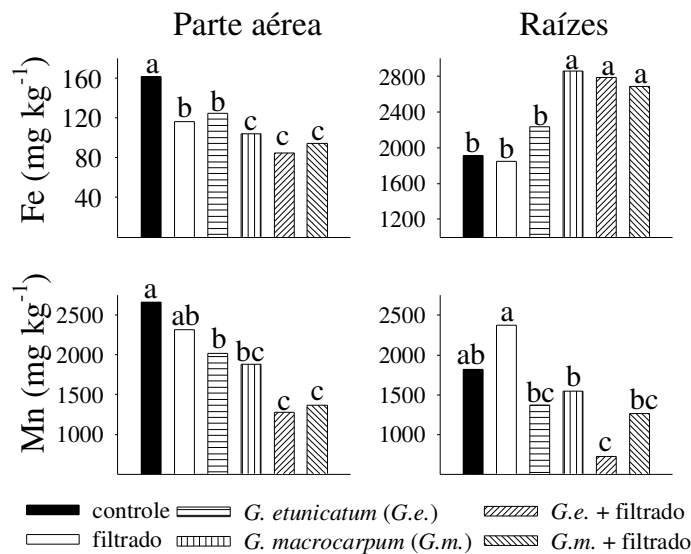
No que se refere ao Mn, Cardoso (1985, 1996) observou que a presença de micorriza diminuiu significativamente sua concentração na parte aérea de plantas de soja, fato também observado por Bethlenfalvai & Franson (1989). Nogueira & Cardoso (2000) verificaram que menores doses de P no substrato propiciaram maiores níveis de colonização radicular de soja pelos FMAs, o que coincidiu com a menor concentração de Fe e Mn nas vagens. Comportamento semelhante foi relatado por Colozzi-Filho & Siqueira (1986) em cafeeiro.



Nesses casos, é possível que tenha havido efeito indireto da micorrização sobre a absorção de Mn pela alteração da comunidade microbiana que atua na sua disponibilidade por mecanismos de oxidação ou redução biológica. Kothari et al. (1991) verificaram que o número de microrganismos redutores de Mn foi trinta vezes menor na rizosfera de plantas micorrizadas, o que resultou em menor absorção do metal pelas plantas. Nogueira & Cardoso (2002) obtiveram evidências de que os mecanismos que regulam a disponibilidade e a absorção de Fe e Mn nas plantas micorrizadas são distintos, mas que há o envolvimento da comunidade microbiana. Enquanto para o Mn houve diminuição da disponibilidade no substrato e conseqüente diminuição dos teores na parte aérea e raízes das plantas micorrizadas, para o Fe houve aumento da disponibilidade no substrato e aumento do teor nas raízes, mas diminuição na parte aérea. Esses efeitos, em geral, foram mais expressivos quando a comunidade microbiana foi restabelecida no solo pela adição de um filtrado do solo natural após autoclavagem para eliminação dos FMAs nativos (Figuras 2 e 3).



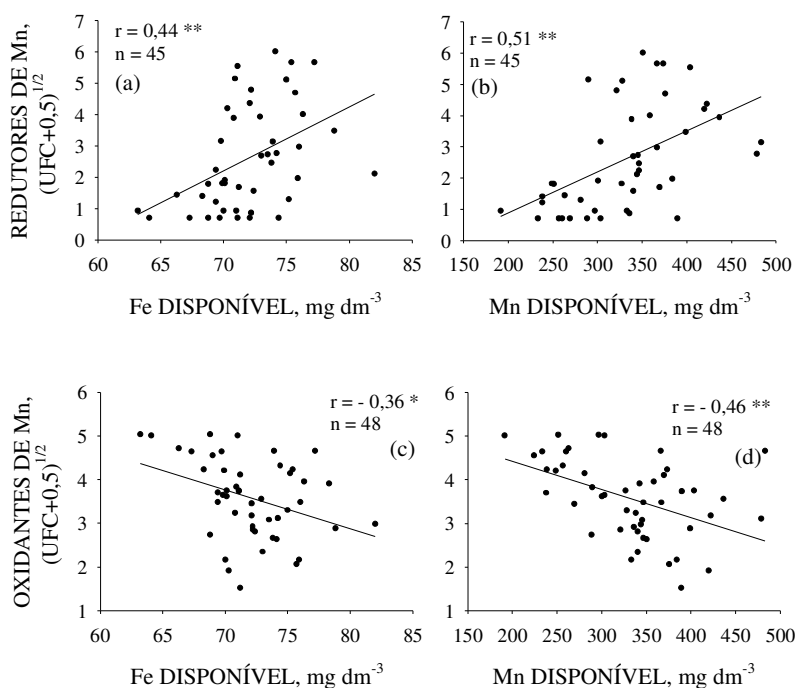
**Figura 2.** Fe e Mn disponíveis no substrato em que foram cultivadas plantas de soja micorrizadas e não micorrizadas, com e sem o restabelecimento da comunidade microbiana nativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a 5%. (Adaptado de Nogueira & Cardoso, 2002).



**Figura 3.** Teores de Fe e Mn na parte aérea e raízes de plantas de soja cultivadas em substrato com alta disponibilidade de Mn, micorrizadas e não micorrizadas, com (+filtrado) e sem o restabelecimento da comunidade microbiana nativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste *t* a 5%. (Adaptado de Nogueira & Cardoso, 2002).

Outro fator que influencia a disponibilidade de Mn é a produção microbiana de ligantes orgânicos (Miyazawa et al., 1993). Em solo esterilizado, não há produção microbiana de ligante orgânico e a disponibilidade de Mn aumenta. Quando a comunidade microbiana é restabelecida, a produção de ligantes causa a diminuição da disponibilidade do Mn. Apesar de esse ser um mecanismo plausível, no trabalho de Nogueira & Cardoso (2002) o restabelecimento da comunidade microbiana somente resultou na diminuição da disponibilidade de Mn na presença de micorriza. Além da diminuição da disponibilidade de metais por produção de quelantes orgânicos, a atividade microbiana também pode alterar sua disponibilidade por atuar no estado de oxidação dos metais. Nogueira (2001) obteve correlações positivas entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias redutoras de Mn no solo e a disponibilidade de Fe e Mn, enquanto que essa correlação foi negativa quando se considerou o número de UFC de bactérias oxidantes de Mn (Figura 4). Isso indica que esses metais têm sua disponibilidade no solo regulada por processos de oxirredução. Dessa forma, se a presença de micorriza favorecer a comunidade de oxidantes em detrimento à de redutores (Kothari et al., 1991; Nogueira et al., 2004), a disponibilidade desses metais às plantas será diminuída.

Nos estudos dos efeitos de metais sobre plantas e fungos micorrízicos ou na sua interação, deve-se evitar o uso de sais como fonte, pois metais recém-adicionados não estão em equilíbrio com os constituintes do solo, como a matéria orgânica, por exemplo (Graham et al., 1986), e, dessa forma, seus efeitos sobre os organismos-alvo são superestimados (Heggo et al., 1990; Guo et al., 1996). Nesse caso, deve-se dar preferência a solos anteriormente contaminados ou que contenham esses metais em excesso naturalmente. Havendo interesse na variação da disponibilidade dos metais, pode-se fazer diluição do solo contaminado com outro não contaminado, mas com as mesmas características.



**Figura 4.** Correlações simples entre o número de bactérias redutoras de Mn e disponibilidade de Fe (a) e Mn (b) no solo e entre bactérias oxidantes de Mn e disponibilidade de Fe (c) e Mn (d) no solo. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ . (Fonte: Nogueira, 2001).

#### 4. Micorrizas Arbusculares como Ferramenta para Recuperação de Áreas Degradadas e Contaminadas pelo Excesso de Metais

Nas duas últimas décadas, maiores atenções foram voltadas para a recuperação de áreas degradadas e contaminadas, principalmente por força da opinião pública e movimentos ambientalistas (Brooks et al., 1998). No Brasil, a obrigatoriedade de recuperação de áreas degradadas por atividades de mineração é garantida pela Constituição Federal e por Leis Complementares (Brasil, 1990).

Dentre os métodos empregados na recuperação de áreas degradadas pelo excesso de metais está a fitoestabilização. Esse método visa restabelecer a vegetação, com a finalidade de reduzir ou eliminar a biodisponibilidade de metais, diminuir as erosões hídrica e eólica, melhorar a qualidade do solo pelo maior aporte de matéria orgânica e reduzir a lixiviação de metais (Shetty et al., 1994; Leyval et al., 1997). No caso de áreas de mineração, a dificuldade está no fato de que o solo original geralmente foi removido, e apresenta limitações quanto à disponibilidade de nutrientes. Em muitos casos, essas áreas possuem excesso de metais pesados, o que dificulta ainda mais o processo. A simbiose micorrízica pode auxiliar a revegetação dessas áreas por aumentar a capacidade das plantas em absorver nutrientes e água (Gildon & Tinker, 1983), aumentando o índice de sobrevivência das mudas utilizadas

(Haselwandter & Bowen, 1996). Além disso, as plantas também podem ser beneficiadas pela proteção contra o excesso de metais, conforme discutido anteriormente. A presença de micorriza ainda favorece a estabilidade dos agregados do solo pela ação das hifas externas (Miller & Jastrow, 1990) e por estimular a produção de exopolissacarídeos pela maior atividade microbiana, que, por sua vez, também atuam na estabilidade de agregados (Haselwandter & Bowen, 1996), tornando o solo mais resistente à erosão eólica e hídrica.

Um dos aspectos mais importantes no que se refere à recuperação de áreas degradadas é o custo da operação. Práticas que reduzam os custos, como, por exemplo, de fertilizantes, são de grande interesse. O uso de leguminosas nodulantes na estabilização de áreas degradadas é vantajoso, pois funciona como fonte de N. Sendo as mudas previamente micorrizadas, também haverá melhor utilização do P, diminuindo-se os custos com esses dois nutrientes. Além disso, existe o efeito sinérgico entre a micorrização e a fixação biológica de nitrogênio, em que as plantas micorrizadas são mais eficientes em fixar N, devido ao seu melhor estado nutricional quanto ao P e demais nutrientes (De la Cruz et al., 1988). Nesse caso, fontes mais baratas de P como rochas fosfáticas também podem ser empregadas. Apesar de sua baixa solubilidade, plantas micorrizadas conseguem utilizar mais eficientemente essa fonte de P (Haselwandter & Bowen, 1996).

Hetrick et al. (1994) estudaram a influência dos FMAs na revegetação de áreas de mineração com altos teores de metais pesados em que a comunidade vegetal não conseguia se restabelecer naturalmente. Tanto plantas consideradas micotróficas obrigatórias quanto facultativas se beneficiaram da micorrização, o que foi atribuído ao aumento da tolerância das plantas ao excesso de metais e à sua melhor nutrição, uma vez que o local de estudo era muito pobre em nutrientes e com baixa capacidade de retenção de água. Plantas de girassol também tiveram maior dependência micorrízica à medida que foram expostas a doses crescentes de Cr. Esse comportamento foi atribuído ao fato de que as plantas micorrizadas absorveram mais P, visto que Cr e P competem pelos mesmos sítios de absorção (Davies Jr. et al., 2001; Andrade, 2005). Shetty et al. (1994) observaram que apenas a planta micotrófica obrigatória teve sua dependência micorrízica aumentada em solo contaminado por Zn, enquanto a micotrófica facultativa não apresentou alteração, mesmo tendo maior colonização radicular. Entretanto, o uso de plantas micotróficas facultativas, desde que resistentes ao excesso de metais, tem a vantagem de possibilitar o aumento do potencial de inóculo de FMA *in situ*, o que facilitará subsequente estabelecimento de espécies micotróficas obrigatórias. Sob condições de estresse causado pelo excesso de metais, os benefícios obtidos por uma planta micorrizada resultam em significativo aumento de crescimento (Díaz et al., 1996), o que aumenta a probabilidade de sucesso na etapa inicial de revegetação. Uma estratégia sugerida por Carneiro et al. (2001) para o restabelecimento de plantas em áreas degradadas pelo excesso de metais pesados é a mistura de espécies vegetais. Nesse caso, a presença de mostarda (Brassicaceae) nessa mistura, embora sendo uma planta que não forma micorriza, é tolerante ao excesso de metais. Seu papel seria imobilizar parte dos metais em excesso, favorecendo o restabelecimento das plantas micotróficas.

Como exposto, o emprego de fungos micorrízicos pode ser vital nos programas que visam a revegetação de áreas contaminadas por metais. Entretanto, é necessário que se faça seleção de endófitos que sejam tolerantes ao contaminante em particular, num determinado local, já que a proteção do hospedeiro pelo FMA quanto ao excesso de metal depende da compatibilidade fungo-hospedeiro (Graham & Eissenstat, 1994; Shetty et al., 1995; Díaz et al., 1996) e de sua interação com o ambiente (Ravnskov & Jakobsen, 1995; Nogueira & Cardoso, 2002). A combinação entre tolerância a metais pelo hospedeiro e pelo simbiote pode aumentar as chances de sucesso da revegetação, resultado de vantagem competitiva a ser obtida pela planta de interesse (Gildon & Tinker, 1983; Khan et al., 2000).

A limitação da prática da micorrização com FMA em extensas áreas é a dificuldade de obtenção de grande quantidade de inóculo, pelo fato de que o FMA não se reproduz sem a presença de um hospedeiro vivo. Em programas de revegetação que empreguem espécies arbustivas e arbóreas, a produção de mudas em viveiro facilita a prática da micorrização. Essas plantas, quando transplantadas para o local de interesse, vão servir como fonte de inóculo para outras plantas (Haselwandter & Bowen, 1996), favorecendo o estabelecimento de espécies micotróficas (Vangronsveld et al., 1996) e, conseqüentemente, a cobertura vegetal e a estabilização da área.

A extensão das respostas das plantas à micorrização e sua persistência vão depender da comunidade nativa de FMAs existente. A ocorrência de espécies mais competitivas em colonizar, porém menos eficientes em auxiliar o hospedeiro, pode levar à diminuição dos efeitos positivos das plantas colonizadas no viveiro com espécies eficientes. Mesmo que isso ocorra, o rápido estabelecimento daquele grupo de plantas no local desejado vai se refletir em maior produção de biomassa mais tarde, pela vantagem competitiva que essas plantas terão (Haselwandter & Bowen, 1996).

A fitoestabilização é uma solução temporária, uma vez que os metais não são eliminados e o risco de sua mobilização da rizosfera e transferência das plantas aos animais permanece. Por tal razão, as plantas utilizadas nessa estratégia deveriam ser capazes de imobilizar os metais em suas raízes, com baixa translocação para a parte aérea (Leyval et al., 1997), fato geralmente observado em plantas micorrizadas.

O uso de FMAs como ferramenta nos procedimentos de revegetação de áreas degradadas e contaminadas por metais necessita mais pesquisas para melhor entender os mecanismos de proteção das plantas contra a toxicidade de metais, especificidade do hospedeiro e sua competitividade no ambiente em que for utilizado.

## Referências

- ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils 2 ed. London: Chapman & Hall, 1995. 368 p.
- ALTEN, H. von; LINDERMANN, A. & SCHOENBECK, F. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. **Mycorrhiza**, v.2, p.167-173, 1993.
- ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; DE ABREU, M.F. & SILVEIRA, A.P.D. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.27, p.945-954, 2003.

ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; DE ABREU, M.F. & SILVEIRA, A.P.D. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbiosis under soybean plants. **Appl. Soil Ecol.**, v.26,p.123-131, 2004.

ANDRADE, S.A.L. Atenuação pela associação micorrízica arbuscular do estresse causado por cádmio em plantas. Campinas, 2005. 100 p. (Tese Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).

ANDRADE, S.A.L.; JORGE, R.A. & SILVEIRA, A.P.D. Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci. Agr.**, v.62, p.389-394, 2005.

BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **New Phytol.**, v.106, p.93-111, 1987.

BARTOLOME-ESTEBAN, H. & SCHENCK, N.C. Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminum saturation. **Mycologia**, v.86, p.217-226, 1994.

BETHLENFALVAY, G.J. & FRANSON, R.L. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. **Journal Pl. Nutr.**, v.12, p.953-970, 1989.

BRASIL. Ministério do Interior. Instituto do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação. Brasília, 1990. 96 p.

BROOKS, R.R.; CHIANUCCI, A. & JAFFRÉ, T. Revegetation and stabilization of mine dumps and other degraded terrain. In: BROOKS, R.R. (Ed.) **Plants that hyperaccumulate heavy metals: Their role in phytoremediation, mineral exploration and phytomining**. New York: CAB International. p. 227-247, 1998.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO, R.B. & NOGUEIRA, M.A. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. **R. Bras. Ci. Solo**, v.26, p.795-799, 2002.

CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.9, p.125-130, 1985.

CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCÓN-AGUILAR, C; BAREA, J.M. (Ed.). **Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development**. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAS, 4., Granada, 1994. Proceedings. Luxemburg: European Commission Report, 1996. p. 304-306.

CARIS, C.; HORDT, W.; HAWKINS, H.J.; HÖMHELD, V. & GEORGE, E. Studies of iron transport by arbuscular mycorrhizal hyphae from soil to peanut and sorghum plants. **Mycorrhiza**, v.8, p.35-39, 1998.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, p.1443-1452, 2001.

CHEN, B.; CHRISTIE, P. & LI, X.. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. **Chemosphere**, v.42, p.185-192, 2001.

CLARK, R.B. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. **Plant Soil**, v.192, p.15-22, 1997.

COLOZZI-FILHO, A. & SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. I. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.10, p.199-205, 1986.

DAVIES JR., F.T.; PURYEAR, J.D.; NEWTON, R.J. et al. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). **Plant Physiol.**, v.158, p.777-786, 2001.

DAVIES, K.L.; DAVIES, M.S. & FRANCIS, D. Zinc- induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. **Plant Cell Environ.**, v.14, p.399-406, 1991.

DEHN, B. & SCHÜEPP, H. Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.29, p.79-83, 1989.

DE LA CRUZ, R.E.; MANALO, M.Q.; AGGANAGAN, N.S. & TAMBALO, J.D. Growth of three legume trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. **Plant Soil**, v.108, p.111-115, 1988.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. **Appl. Soil Ecol.**, v.11, p.261-269, 1999a.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. **Appl. Env. Microbiol.**, v.65, p.718-723, 1999b.

DÍAZ, G.; AZCÓN-AGUILAR, C. & HONRUBIA, M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. **Plant Soil**, v.180, p.241-249, 1996.

FRANCIS, R. & READ, D.J. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. & MALAJCZUK, N. (Eds.) **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 11-25, 1994.

GALLI, U.; SCHÜEPP, H. & BRONOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiol. Plant.**, v.92, p.364-368, 1994.

GALLI, U.; SCHÜEPP, H. & BRONOLD, C. Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Physiol. Plant.**, v.94, p.247-253, 1995.

GILDON, A. & TINKER, P.B. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. the effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytol.** v.95, p.247-261, 1983.

GONZALEZ-CHAVEZ, C.; D'HAEN, J.; VANGROSVELD, J. & DODD, J.C. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant Soil**, v.240, p.287-297, 2002.

- GONZALEZ-CHAVEZ, M.C.; CARRILO-GONZALEZ, R.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environ. Pollut.**, v.130, p.317-323, 2004.
- GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. & FARDELMANN, D. Toxicity of fungicidal copper in soil to citrus seedlings and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology**, v.76, p.66-70, 1986.
- GRAHAM, J.H. & EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant Soil**, v.159, p.179-185, 1994.
- GRIFFIOEN, W.A.J.; IETSWAART, J.H. & ERNST, W.H.O. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaries* population on a copper contaminated soil. **Plant Soil**, v.158, p.83-89, 1994.
- GUO, Y.; GEORGE, E. & MARSCHNER, H. Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. **Plant Soil**, v.184, p.195-205, 1996.
- HASELWANDTER, K. & BOWEN, G.D. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. **Forest Ecol. Manage.**, v.81, p.1-17, 1996.
- HEGGO, A.; ANGLE, J.S. & CHANEY, R.L. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. **Soil. Biol. Biochem.**, v.22, p.865-869, 1990.
- HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T. & FIGGE, D.A.H. The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation on heavy metal mine spoil. **Environ. Pollut.**, v.86, p.171-179, 1994.
- HILDEBRANDT, U.; KALDORF, M. & BOTHE, H. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. **J. Plant Physiol.**, v.154, p.709-717, 1999.
- IETSWAART, J.H.; GRIFFIOEN, W.A.J. & ERNST, W.H.O. Seasonality of VAM infection in three population of *Agrostis capillaries* (Gramineae) on soil with or without heavy metal enrichment. **Plant Soil**, v.139, p.67-73, 1992.
- JONER, E.J.; BRIONES, R. & LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant Soil**, v.226, p.227-234, 2000.
- JONER, E.J. & LEYVAL, C. Uptake of <sup>109</sup>Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* / *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentration of cadmium. **New Phytol.**, v.135, p.353-360, 1997.
- KALDORF, M.; KUHN, A.J.; SCHRÖDER, W.H.; HILDEBRANDT, U. & BOTHE, H. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **J. Plant Physiol.**, v.154, p.718-728, 1999.
- KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M., KHOO, C.S. & HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v.41, p.197-207, 2000.
- KILLHAM, K. & FIRESTONE, M. K. Vesicular-arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. **Plant Soil**, v.72, p.39-48, 1983.
- KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.26, p.125-134, 2002.



KOOMEN, I.; McGRATH, S.P. & GILLER, I. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.871-873, 1990.

KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rizosphere and manganese concentrations in maizd (*Zea mays* L.). **New Phytol.**, v.117, p.649-655, 1991.

LEE, J.; SHIM, D.; SONG, W.Y.; HWANG, I. & LEE, Y. Arabidopsis metallothioneins 2 and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. **Plant Mol. Biol.**, v.54, p.805-815, 2004.

LEYVAL, C.; TURNAU, K. & HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, v.7, p.139-153, 1997.

LINDERMANN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rizosphere microflora: the mycorrizosphere effect. **Phytopathology**, v.78, p.366-371, 1988.

MALCOVÁ, R. & GRYNDLER, M. Amelioration of Pb and Mn toxicity to arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* by maize root exudates. **Biol. Plant.**, v.47, p.297-299, 2003.

MALCOVÁ, R.; RYDLOVÁ, J. & VOSÁTKA, M. Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. **Mycorrhiza**, v.13, p.151-157, 2003.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MEDEIROS, C.A.B.; CLARK, R.B. & ELLIS, J.R. Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. **J. Plant Nutr.**, v.18, p.201-217, 1995.

MILLER, R.M. & JASTROW, J. Hierarchy of root and mycorrhizal fungi interaction with soil aggregation. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.579-584, 1990.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. & MARTIN-NETO, L. Provável mecanismo de liberação de manganês no solo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.28, p.725-731, 1993.

NOGUEIRA, M.A. & CARDOSO, E.J.B.N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. **Rev. Bras. Ci. Solo.**, v.24, p.329-338, 2000.

NOGUEIRA, M.A. Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. Piracicaba, 2001. 195 p. (Tese Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).

NOGUEIRA, M.A. & CARDOSO, E.J.B.N. Interações microbianas alteram a disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.37, p.1605-1612, 2002.

NOGUEIRA, M.A. & CARDOSO, E.J.B.N. Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. **Scient. Agr.**, v.60, p.329-335, 2003.

NOGUEIRA, M.A.; MAGALHÃES, G.C.; CARDOSO, E.J.B.N. Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. **J. Pl. Nutr.**, v.27, p.141-156, 2004.

- OLSSON, P.A.; FRANCIS, R.; READ, D.J. & SÖDERSTRÖM, B. Growth of arbuscular mycorrhizal mycelium in calcareous dune sand and its interaction with other soil microorganisms as estimated by measurement of specific fatty acids. **Plant Soil**, v.201, p.9-16, 1998.
- RAVNSKOV, S. & JAKOBSEN, I. Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. **New Phytol.**, v.129, p.611-618, 1995.
- REID, C.P.P. Mycorrhizas. In: LYNCH, J.M. (ed.) **The Rhizosphere**. Chichester: John Wiley & Sons. p. 281-315, 1990.
- REPETTO, O.; BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. **New Phytol.**, v.157, p.555-567, 2003.
- RODELLA, A.A. & ALCARDE, J.C. Legislação sobre micronutrientes e metais pesados. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B. van & ABREU, C.A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura** (Ed.). Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFÓS. p. 556-576, 2001.
- SCOT, J.A.; PALMER, S.J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.33, p.221-225, 1990.
- SHETTY, K.G.; HETRICK, B.A.D.; FIGGE, D.A.H. & SCHWAB, A.P. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. **Environ. Pollut.**, v.86, p.181-188, 1994.
- SHETTY, K.G.; HETRICK, B.A.D.; SCHWAB, A.P. Effects of mycorrhizae and fertilizers amendments on zinc tolerance of plants. **Environ. Pollut.**, v.88, p.307-314, 1995.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C. & LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, v.363, p.67-69, 1993.
- SIQUEIRA, J.O.; PEREIRA, M.A.M.; SIMÃO, J.B.P. & MOREIRA, F.M.S. Efeito da formononetina (7 Hidroxi, 4' metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.23, p.561-567, 1999a.
- SIQUIERA, J.O.; POUYÚ, E. & MOREIRA, F.M.S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.23, p.569-580, 1999b.
- STEVENINCK, R.F.M. van; STEVENINCK, M.E. van; FERNANDO, D.R.; HORST, W.J. & MARSCHNER, H. Deposition of zinc phytate in globular bodies in roots of *Deschampsia caespitosa* ecotypes: A detoxification mechanism? **J. Plant Physiol.**, v.131, p.247-257, 1987.
- TRINDADE, A.V.; VILDOSO, C.I.A.; MUCHOVEJ, R.M. et al. Interação de composto de lixo urbano e fungos micorrízicos na nutrição e crescimento do milho. **R. Bras. Ci. Solo**, v.20, p.199-208, 1996.
- TULLIO, M.; PIERANDREI, F.; SALERNO, A. & REA, E. Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from cadmium-polluted and unpolluted soil. **Biol. Fert. Soils**, v.37, p.211-214, 2003.

TURNAU, K.; KOTTKE, I. & OBERWINKLER, F. Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. **New Phytol.**, v.123, p.313-324, 1993.

VANGRONSVELD, J.; COLPAERT, J.V. & TICHELEN, K. K. van Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environ. Pollut.**, v.94, p.131-140, 1996.

WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C & BERTHELIN, J. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. **Plant Soil**, v.157, p.247-256, 1993.

WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. **Plant Soil**, v.167, p.189-196, 1994.

WEISSENHORN, I. & LEYVAL, C. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. **Plant Soil**, v.175, p.233-238, 1995.

WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C & BERTHELIN, J. Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. **Biol. Fertil. Soils**, v.19, p.22-28, 1995.

ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P. & LAIDLAW, A.S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v.42, p.193-199, 2001.

# Capítulo 13

## Interações Microbianas e Controle de Fitopatógenos Na Rizosfera

Júlio Alves **CARDOSO FILHO** <sup>(1)</sup> e Marli Teixeira de Almeida **MINHONI** <sup>(2)</sup>

### 1. Introdução

Do ponto de vista microbiológico, o solo é um ambiente estressante e limitante em termos de nutrientes, mas capaz de sustentar uma comunidade microbiana extremamente diversificada e dinâmica (Dommengues et al., 1978; Gottschal, 1990), que atua nos processos de decomposição da matéria orgânica e nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, mediando sua disponibilidade. Estima-se que a comunidade microbiana ocupe menos de 5% do espaço poroso do solo (Siqueira et al., 1994) e calcula-se que cerca 90% da sua atividade seja por bactérias e fungos (Vancura & Kunc, 1988). Solos minerais e orgânicos abrigam eubactérias, arqueobactérias, fungos filamentosos, leveduras, microalgas, protozoários, nematóides e diversos animais invertebrados com funções ecológicas bem definidas (Curl & Harper, 1990). O número de microrganismos e sua biomassa coletiva variam dentro e entre os diversos tipos de ecossistemas e agroecossistemas. A biomassa microbiana total no solo funciona como um reservatório de nutrientes para as plantas (Grisi & Gray, 1986), pois é um componente lábil da matéria orgânica do solo e, portanto, possui uma atividade que é influenciada por fatores bióticos e abióticos do ambiente. Desse modo, seu monitoramento pode refletir possíveis modificações no solo e ser um excelente indicativo biológico das alterações resultantes do manejo do solo (Balota et al., 1998). Essas alterações, provocadas pelo uso e manejo do solo, acarretam modificações quantitativas e qualitativas na microbiota como um todo, forçando-a a um novo equilíbrio (Dick & Tabatabai, 1992; Wardle & Hungria, 1994).

---

<sup>(1)</sup> Professor, Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Campus Delza Gitaí, BR 104 Norte, Km 85, CEP – 57100 – 000, Rio Largo, AL. E-mail: julioalvescardosofilho@yahoo.com.br

<sup>(2)</sup> Professora, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Lageado, CEP- 18610-307, Botucatu, SP. E-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

A comunidade microbiana presente nos diversos solos atua de modo direto e/ou indireto no controle de fitopatógenos, relacionados principalmente aos causadores de podridões de sementes, raízes e colo de plantas. A agricultura sustentável depende da atividade de diversos grupos microbianos e de suas funções no solo, o que condiciona a dinâmica e equilíbrio do sistema. Nesse processo, citam-se vários tipos de interações microbianas em que as plantas excretam sais minerais, aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares que favorecem o crescimento de microrganismos epífitos ou da rizosfera (Tokeshi, 2000).

## 2. Interação de Rizobactérias e Bactérias Fitopatogênicas

Nos últimos anos existem poucos estudos acerca da aplicação de rizobactérias em sementes e raízes com o propósito de controlar doenças bacterianas (Whipps, 2001). Apesar disso, dentre os exemplos de sucesso podemos citar a aplicação de estirpes não fitopatogênicas de *Streptomyces* no biocontrole da sarna da batata (*Solanum tuberosum* L.) causada por *Streptomyces scabies* (Ryan & Kinkel, 1997). Nesse experimento o biocontrole foi operado por antibiose ou competição por espaço ou nutrientes na rizosfera. Em contraste, em experimento com *Pseudomonas fluorescens* F113, a antibiose, pela produção de 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), foi o mecanismo responsável pelo biocontrole da podridão mole da batata, causada por *Erwinia carotovora* sub-espécie atroseptica. Algumas evidências mostraram que a produção de sideróforos por *P. fluorescens* F113 pode ser um importante fator no biocontrole de *E. carotovora* em condições limitantes de ferro. Entretanto a produção de DAPG ainda foi o mecanismo prevaiente (Neemo-Eckwall & Schottel, 1999). O uso de espécies de *Pseudomonas* no biocontrole de galhas, em monocotiledôneas e dicotiledôneas, causadas por *Agrobacterium tumefaciens* já foi testado com sucesso (Khmel et al., 1998). Estudos com marcadores moleculares mostraram, no caso da estirpe de *Agrobacterium* K84, que a antibiose, pela produção de agrocina (codificada pelo plasmídeo pAgK84), é um mecanismo de ação bastante eficaz para o controle de *A. tumefaciens*. Entretanto, devido ao risco ambiental do plasmídeo pAgK84 ser transferido no solo para estirpes patogênicas de *A. tumefaciens* e reduzir a eficiência do biocontrole (Vicedo et al., 1996), essa estirpe não tem sido utilizada comercialmente. A antibiose, por antibióticos como agrocina 434 (McClure et al., 1998), e a por competição podem ser considerados os mecanismos mais importantes para a eficiência dessas bactérias no solo como agentes de controle biológico (Peñalver et al., 1994).

## 3. Interação de Rizobactérias e Fungos Fitopatogênicos

Alguns exemplos de interações na rizosfera e espermosfera entre rizobactérias e fungos fitopatogênicos podem ser vistos na Tabela 1.

Claramente nota-se que um grande número de trabalhos encontrados na literatura envolve espécies de *Pseudomonas* (Whipps, 2001). Essa rizobactéria tem a característica de crescimento rápido em meio de cultura, é de fácil manipulação genética

em laboratório e é capaz de crescer em uma grande variedade de compostos orgânicos, o que a torna bastante promissora para utilização em experimentos de laboratório e de campo (Marilley & Aragno, 1999).

**Tabela 1.** Exemplos de rizobactérias aplicadas em sementes e raízes para o biocontrole de fungos fitopatogênicos.

Bactéria	Fungo fitopatogênico	Planta	Ambiente
<i>Actinoplanes</i> spp.	<i>Pythium ultimum</i>	beterraba	solo
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	trigo	solo
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	caupi	solo
<i>B. subtilis</i> BACT-D	<i>Pythium aphanidermatum</i>	tomate	solo
<i>Burkholderia cepacia</i> A3R	<i>Fusarium graminearum</i>	trigo	solo
<i>B. cepacia</i> PHQM 100	<i>Fusarium</i> spp.	milho	solo
<i>Comamonas acidovorans</i> HF42 e <i>Enterobacter</i> sp. BF14	<i>Magnaporthe poae</i>	grama Kentucky	solo
<i>Paecilobacillus</i> sp. 300	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucurbitácea	solo
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> AB244	<i>Pythium ultimum</i>	tomate	solo/argila
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL 1391	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	tomate	solo
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	<i>Drechslera graminea</i>	cevada	solo
<i>Pseudomonas corruga</i> 13	<i>Pythium aphanidermatum</i>	cucurbitáceas	solo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	rabanete	solo/areia
<i>P. fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	rabanete	brita
<i>Serratia phymuthica</i>	<i>Pythium ultimum</i>	cucurbitáceas	perlita/vermiculita
<i>Streptomyces</i> sp. 385	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucurbitáceas	solo

Fonte: Adaptado de Whipps (2001).

## 2.2. Mecanismos de Supressão de Fungos Fitopatogênicos por Rizobactérias

### a) Antibiose

Existem inúmeros relatos da produção de metabólitos antifúngicos produzidos *in vitro* por rizobactérias que eventualmente têm atividade *in vivo* (Whipps, 2001). Dentre estes pode-se citar:  $\text{NH}_4^+$ , butirrolactonas, 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG), HCN, canosamina, oligomicina A, oomicina A, ácido fenazina carboxílico (PCA), piluterina (Plt), pirrolnitrina (Pln), vicosinamida, xantobaccina e zitermicina A (Whipps, 2001).

Alternativamente relata-se o uso de genes - repórteres ou sondas para a produção de antibióticos na rizosfera (Kraus & Loper, 1995; Chin-A-Woeng et al., 1998), bem como o isolamento e a caracterização de genes ou agrupamento de genes ("genes clusters") responsáveis pela produção de antibióticos (Kraus & Loper, 1995; Kang et al., 1998; Nowak-Thompson et al., 1999).

A produção de antibióticos por rizobactérias, particularmente *Pseudomonas* spp., tem como possível regulador um sistema componente duplo envolvendo um sensor ambiental (provavelmente uma proteína membranar) e um fator citoplasmático (Keel & Défago, 1997). No entanto os sinais ambientais que controlam esse sistema ainda permanecem desconhecidos (Whipps, 2001).

Outros sistemas de regulação já foram identificados envolvendo a produção de PCA por espécies de *Pseudomonas* (Whipps, 2001), particularmente, em *Pseudomonas aureofasciens* 30-84, que controla em trigo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* pela da produção de PCA (Pierson III & Pierson, 1996). Nesse sistema o patógeno cresce nas raízes aumentando a exsudação radicular, o que resulta em um aumento na população de *P. aureofasciens* 30-84 e outras bactérias rizosféricas no sítio de infecção. Conseqüentemente, ocorre uma elevação na concentração do sinal molecular N-acil-L-homoserina lactona (HSL) que é produzido pelo gene *phzR*. Desse modo com a produção de PCA inibe o patógeno. Isso pode explicar porque *P. aureofasciens* 30-84 não reduz o número de sítios de infecção na raiz, apenas inibe o crescimento secundário do patógeno. Quantidades significativas de HSL de outras bactérias rizosféricas podem contribuir com a produção de PCA, aumentando a importância da sinalização interpopulacional no biocontrole e talvez ajudando a atuação de certos isolados bacterianos quando misturados e introduzidos com outras bactérias da rizosfera (Pierson & Weller, 1994).

## **b) Competição por Ferro**

Muito embora a competição por espaço e nutrientes entre rizobactérias e fungos fitopatogênicos já esteja bem estabelecida na literatura (Whipps, 1997a), o interesse pela competição pelo ferro rizosférico é recente (Whipps, 2001). Em condições limitantes de ferro, as rizobactérias produzem uma variedade de agentes quelantes de ferro (sideróforos). Os sideróforos retiram ferro existente no solo, tornando-o indisponível para os fungos fitopatogênicos, restringindo o seu crescimento (Loper & Henkels, 1999). Estudos recentes demonstraram que a suplementação mineral de ferro para as plantas influencia a estrutura da comunidade rizosférica (Yang & Crowley, 2000).

A competição por ferro entre espécies de *Pseudomonas* e *Pythium* spp. e *Fusarium* spp., particularmente o papel do sideróforo pioverdina, tem sido intensamente estudada e demonstrada. Espécies de *Pseudomonas*, particularmente *P. aeruginosa*, podem produzir outros tipos de sideróforos, tais como a pioquelina, um precursor do ácido salicílico que reconhecidamente contribui para a proteção de plantas de tomate infectadas com *Pythium* spp (Buysens et al., 1996). No entanto, nem todos os tipos de sideróforos estão envolvidos no controle de fitopatógenos. Sabe-se que diferentes fatores ambientais (bióticos e abióticos) podem estimular ou reprimir a síntese de sideróforos na rizosfera. Entretanto ainda se sabe muito pouco a respeito disso (Duffy & Défago, 1999). Alguns sideróforos podem atuar como indutores de resistência sistêmica contra fitopatógenos em algumas plantas (Leeman et al., 1996a).

### c) Parasitismo e Produção de Enzimas Extracelulares

A habilidade de certas bactérias, especialmente as actinomicetáceas, em parasitar e degradar esporos de fungos fitopatogênicos já está bem documentada na literatura (El-Tarabily et al., 1997). Assumindo que os nutrientes passem do fitopatógeno para a bactéria e que o crescimento do fungo fitopatogênico seja inibido, o espectro do parasitismo pode variar de uma simples ligação entre células e hifas, como na interação entre *Enterobacter cloacae* e *Pythium ultimum* (Nelson et al., 1986) até a completa lise e degradação da hifa como na interação entre *Arthrobacter* spp. e *Pythium debaryanum* (Mitchell & Hurwitz, 1965).

Enzimas quitinolíticas produzidas por *Bacillus cereus* e *Pantoea* (*Enterobacter*) *agglomerans* parecem estar envolvidas no controle de *Rhizoctonia solani* (Chermin et al., 1995). Proteases extracelulares também foram a causa do controle de *Pythium ultimum* na rizosfera de beterraba de mesa por *Stenotrophomonas maltophilia* (Dunne et al., 1997).

### d) Indução de Resistência

A partir de 1996, surgiram vários relatos apontando para a ocorrência de resistência induzida por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCPs), que não envolviam o ácido salicílico (AS). Esse tipo de resistência é mediado por vias de sinalização sensíveis a etileno e jasmonatos (JA). Para distinguir os dois tipos de resistência induzida, Van Loon propôs que aquela dependente de AS fosse chamada RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) e a outra fosse chamada de RSI (Resistência Sistêmica Induzida) (Hammerschmidt, 1999; Knoester et al., 1999; Mauch-mani & Metraux, 1998).

Embora se classifique a RSI como independente de AS, existem casos em que a indução de RSI, com uso de etileno ou similar, induz não só a síntese de AS, mas também a de proteínas RPs (proteínas relacionadas à patogênese) (Jacobs et al., 1999; Kozłowski, et al., 1999). Segundo Mauchi-Mani & Metraux (1998), a síntese de proteínas PRs estaria ligada à RSA e à produção de AS, enquanto as defensinas seriam sintetizadas na RSI, com mediação de etileno / JA. Segundo Knoester et al. (1999), tanto RSA como RSI são dependentes de um mesmo fator, provavelmente localizado no início da cadeia de sinais. Já Bostock (1999) sugere uma interação ora negativa, com uma via inibindo a outra, ora positiva, com uma relação de complementaridade entre as duas vias. Ao que parece, cada sistema planta - indutor pode ter um sistema diferente de indução, seja RSI ou RSA, e em alguns casos deve haver uma interrelação entre os dois sistemas.

Embora, a indução da resistência sistêmica adquirida não seja dependente do desenvolvimento de reação de hipersensibilidade (RH), sua expressão é maximizada quando o patógeno indutor causa necrose. Ao contrário, as rizobactérias indutoras tipicamente não causam sintomas visíveis no hospedeiro e usualmente causam um aumento no crescimento (daí a denominação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal). Existem critérios úteis para comparar as características da RSI mediada por rizobactérias e a RSA (Van Loon et al., 1998):



(i) ausência de efeitos tóxicos do agente indutor no patógeno desafiador; (ii) supressão da indução de resistência, pela aplicação prévia de um inibidor específico, tal como actinomicina D, que influencia a expressão gênica da planta; (iii) necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e a observação de proteção na planta; (iv) ausência de uma correlação típica dependente de dose, conhecida para componentes tóxicos; (v) proteção não específica; RSI mediada por rizobactérias, como a RSA, é efetiva contra diversas doenças; (vi) proteção local e sistêmica; e (vii) sujeita ao genótipo do vegetal.

Na literatura existem vários exemplos de RSI induzidas por rizobactérias, principalmente por espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* dentre os quais: rabanete (*Raphanus sativus*) e *Arabidopsis* contra *Fusarium oxysporum* (Leeman et al., 1995) e pepino (*Cucumis sativus*) contra *Pythium aphanidermatum* (Chen et al., 1998).

Diversas combinações de tempo e espaço mostraram que as rizobactérias podem diferir na habilidade em induzir resistência, e que algumas são ativadas em determinados tipos de combinação planta-rizobactéria, ainda podendo ocorrer variações dentro de uma mesma espécie vegetal (Van Loon, 1997).

### 3. Interação de Rizobactérias e Nematóides

O termo rizobactéria normalmente é aplicado para bactérias com habilidade de colonizar raízes de plantas (Schroth & Hancock, 1982). Algumas espécies de rizobactérias receberam a denominação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, visto que geralmente promovem incrementos no crescimento vegetal pela colonização do sistema radicular, podendo impedir o estabelecimento ou até mesmo suprimir a colonização de microrganismos rizosféricos fitopatogênicos (Schroth & Hancock, 1982). A maioria das rizobactérias com potencial para o biocontrole de fitopatógenos tem a capacidade de produzir toxinas e outros produtos metabólicos, com atividade nematicida.

As rizobactérias usadas como antagonistas biológicos de fitonematóides podem ser agrupadas em bactérias parasitas e não parasitas (Siddiqui & Mahmood, 1999).

#### 3.1. Rizobactérias Parasitas

A bactéria *Pasteuria penetrans* já vem sendo estudada desde a década de 1980 (Sayre, 1980). Essa bactéria apresenta um considerável potencial no controle de espécies de *Meloidogyne* (Brown et al., 1985). Descrita em 1940 por Thorne como protozoário, essa bactéria é um parasita obrigatório de nematóides, não possui flagelo e, portanto, sua dispersão no solo depende da água, de animais ou de práticas de cultivo. Possui uma vasta gama de hospedeiros e já foi identificada em vários países, em diversos continentes (Siddiqui & Mahmood, 1999). Observações indicam que *P. penetrans* está provavelmente agrupada em diferentes "formas" ou diferentes

espécies, que possivelmente apresentam uma gama limitada de hospedeiros (Sturhan, 1988). O principal grupo de *P. penetrans* inclui *P. penetrans sensu stricto*, que parasita *Meloidogyne* spp. e *P. thornei* que parasita *Pratylenchus brachyurus*. A identificação dessas espécies é efetuada pelo tamanho do endósporo, forma, ciclo de desenvolvimento e especificidade hospedeira (Starr & Sayre, 1988). Dentre as outras espécies desse gênero, pode-se destacar ainda *P. nishizawae* (Sayre et al., 1991), que é uma bactéria formadora de endósporo e parasita fêmeas adultas de espécies de *Heterodera* e *Globodera*. Essa espécie é diferenciada a partir de características ultraestruturais e uma única gama de hospedeiros (Siddiqui & Mahmood, 1999). A possibilidade da existência de estirpes de biótipos de *P. penetrans* já foi descrita em inúmeros trabalhos (Sturhan, 1988; Syare et al., 1991; Ciancio, 1995). A gama de hospedeiros de cada isolado parece ser limitada e com elevado grau de especificidade (Dutky & Sayre, 1978). O número de esporos pode diferir entre populações de uma mesma espécie (Sayre & Starr, 1985). Para Ratnasoma & Gowen (1991), essa característica parece estar relacionada com a taxa de crescimento das colônias de *P. penetrans*.

Sharma & Davies (1996) caracterizaram diversos isolados de *P. penetrans*, baseando-se na gama de hospedeiros, diâmetro e tamanho do endósporo e aspectos serológicos. Ainda de acordo com esses autores, a grande diversidade observada nas características morfométricas do endósporo parece ser uma resultante da evolução adaptativa que ocorreu durante a especiação do hospedeiro.

*P. penetrans* completa seu ciclo vital (18 a 20 dias) em diferentes nematóides (Kaplan, 1992). Seus esporos aderem à cutícula de estádios juvenis (J2) de fêmeas jovens, quando essas migram pelo solo. A germinação ocorre dentro das raízes quando as formas J2 iniciam a alimentação. Um tubo germinativo emerge e penetra a cutícula e microcolônias começam a proliferar no interior do nematóide. Subseqüentemente as microcolônias preenchem todo corpo do hospedeiro e inicia-se o processo de esporulação, impedindo o seu processo de reprodução (Sayre & Wergin, 1977). Em média, cerca de cinco esporos por nematóides são necessários para que haja a infecção (Stirling, 1984). Diversos fatores abióticos podem interferir na atuação de *P. penetrans*, sendo os mais importantes: a temperatura com um ótimo entre 22,5 e 30°C (Stirling, 1984), o pH (ótimo entre 4,8 e 8,5) e a umidade do solo (com um ótimo entre 34 e 70% da capacidade de retenção de umidade do solo), para formas adultas e juvenis, de acordo com Adiko & Gowen (1994).

*P. penetrans* possui certa tolerância a nematicidas e pode ser aplicado juntamente com algumas formulações (Aldicarb, Carbofuran, Fenamifos) no controle de fitonematóides (Mankau & Prasad, 1972; Maheswari et al., 1987; Walker & Wachtel, 1988). Tem muitas características que a tornam um potencial agente biológico no controle de fitonematóides, visto que não só previne a reprodução, como reduz a infectividade de formas juvenis. Apesar de ainda não existir produto comercial, sua capacidade de persistir no solo, mesmo em condições adversas de temperatura e umidade, a torna um promissor antagonista biológico para fitonematóides.

### 3.2. Rizobactérias Não Parasitas

Algumas bactérias não parasitas também podem apresentar capacidade para o controle de fitonematóides (Tabela 2), dentre as quais estão: *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Desulfovibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. e *Streptomyces* spp. (Siddiqui & Mahmmod, 1999).

**Tabela 2.** Efeitos de bactérias rizosféricas não patogênicas no controle de fitonematóides e crescimento vegetal.

Bactéria	Nematóide	Efeito no hospedeiro
<b>Bacillus</b>		
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Meloidogyne</i>	previne a formação de galhas
<i>B. cereus</i>	<i>Heterodera cajani</i>	ação larvicida
<i>B. cereus</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	impede a penetração na raiz
<i>B. subtilis</i>	<i>Rotylenchulus</i>	reduz a capacidade reprodutiva
<b>Pseudomonas</b>		
<i>P. fluorescens</i>	<i>Panagrellus</i>	ação larvicida
<i>P. fluorescens</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	redução na multiplicação
<b>Streptomyces</b>		
<i>S. isolado CR-43</i>	<i>Pratylenchus penetrans</i>	redução na multiplicação
<i>S. isolado CR-43</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	redução na multiplicação
<b>Clostridium</b>		
<i>C. butyricum</i>	<i>Tylenchorhynchus martini</i>	ação nematicida
<b>Serratia</b>		
<i>S. marcescens</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	ação nematicida
<b>Agrobacterium</b>		
<i>A. radiobacter</i>	<i>Globodera pallida</i>	redução na capacidade infectiva

Fonte: Adaptado de Siddiqui & Mahmood (1999).

As rizobactérias não parasitas podem ser aplicadas junto à semente ou diretamente no solo em condições de casa de vegetação ou de campo (Siddiqui & Mahmood, 1993). A associação dessas bactérias com outros microrganismos, tais como rizóbios, fungos micorrízicos arbusculares e fungos saprófitas (Tabela 3) é bastante viável tanto do ponto de vista econômico quanto prático (Siddiqui & Mahmood, 1999).

### 3.3. Possíveis Mecanismos de Supressão de Fitonematóides por Rizobactérias

Os dois grupos de bactérias (parasitas e não parasitas de nematóides) possuem grandes diferenças em relação às formas de atuação (Siddiqui & Mahmood, 1999). Bactérias parasitas como *P. penetrans* possuem a capacidade de parasitar fêmeas adultas e formas jovens de nematóides. Uma outra estratégia é encontrada em bactérias

não parasitas: promovem efeitos adversos na relação entre a planta infectada e o fitonematóide. Essas bactérias regulam o comportamento do nematóide durante a fase inicial de penetração na raiz da planta hospedeira (Sikora et al., 1989). Dois mecanismos de ação podem ser responsáveis pela redução na taxa de infecção da raiz: (i) produção de metabólitos que reduzem a comunicação entre a planta hospedeira e o nematóide e (ii) degradação de exsudatos provenientes da raiz que controlam o comportamento do fitonematóide (Siddiqui & Mahmood, 1999).

**Tabela 3.** Efeito de rizobactérias não parasitas em combinação com outros agentes biológicos na reprodução de nematóides e crescimento vegetal.

Manejo combinado	Nematóide	Efeito no nematóide e crescimento vegetal
<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Pseudomonas mindocina</i> + <i>Acrophialophora fusispora</i> + <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	Redução no índice de infecção. <i>P. mindocina</i> teve efeito adverso no crescimento da planta, enquanto que os outros agentes biológicos promoveram incrementos no crescimento vegetal.
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Pseudomonas lilacinus</i> + <i>Eichhornia crassipes</i>	<i>M. incognita</i>	Redução na multiplicação do nematóide.
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i> + <i>Glomus fasciculatum</i>	<i>Heterodera cajani</i>	Incremento no crescimento vegetal e redução na multiplicação do nematóide.

Fonte: Adaptado de Siddiqui & Mahmood (1999).

O efeito de rizobactérias não parasitas na penetração de fitonematóides é possivelmente devido a uma ligação entre a bactéria e lectinas na superfície da raiz e, portanto, interfere no reconhecimento entre nematóide e planta hospedeira. Em solos bem aerados,  $\text{NH}_4^+$  é geralmente produzido por bactérias amonificantes durante a decomposição de compostos orgânicos nitrogenados (Rodriguez-Kabana, 1986), resultando na diminuição da comunidade de fitonematóides. Uma outra importante rizobactéria, *Clostridium butyricum*, produz ácido butírico (Hollis & Rodriguez-Kabana, 1967), enquanto *Desulfovibrio desulfuricans* produz  $\text{H}_2\text{S}$ , que, atuando isoladamente ou em conjunto, reduzem a comunidade de fitonematóides. *Pseudomonas fluorescens* atua no controle de fitonematóides, por antagonismo direto, pela produção de antibióticos ou por competição por nutrientes essenciais, tais como o ferro (Siddiqui & Mahmood, 1999). Recentemente a indução de resistência sistêmica foi considerada por Wei et al. (1996) como um dos possíveis mecanismos de controle por rizobactérias não parasitas. Isso seria devido ao acúmulo de quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases peroxidases e proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR) (Lawton & Lamb, 1987), acúmulo de fitoalexinas (Kuc & Rush, 1985) e formação de biopolímeros tais como lignina, calose e proteínas ricas em hidroxiprolinas (Hammerschmidt et al., 1984).

#### 4. Interação entre Fungos e Protozoários

O protozoário do solo *Plasmodiophora brassicae* é ecologicamente um biotrófico de brássicas, constituindo-se em agente causador de galhas. Alguns estudos apontam o fungo *Heteroconium chaetospora* como possível agente controlador de *P. brassicae* em *Brassica campestris* em solo não esterilizado (Narisawa et al., 1998). Esses estudos demonstraram que as hifas de *H. chaetospora* colonizam células epidérmicas; entretanto o mecanismo de controle da doença ainda não está elucidado. *H. chaetospora* parece formar uma simbiose mutualística com *B. campestris*, o que é de bastante interesse, visto que as brássicas não formam associações micorrízicas. *H. chaetospora* ainda pode colonizar raízes de oito famílias de plantas. A habilidade desse fungo em controlar doenças em outras espécies vegetais e os mecanismos envolvidos ainda está em fase inicial de estudo (Narisawa et al., 2000).

#### 5. Interações entre Fungos e Fungos Fitopatogênicos

Interações entre fungos e fungos fitopatogênicos continuam ser foco de grande interesse no mundo (Whipps, 1997b; Whipps, 2001) e no Brasil (Homechin, 1991; Melo, 1991). Alguns exemplos da interação fungo-fungo fitopatogênico são apresentados na tabela 4. Existe uma grande variedade de espécies fúngicas e isolados estudados como agentes de biocontrole; entretanto, os relatos de espécies de *Trichoderma* são dominantes na literatura, talvez refletindo a sua facilidade de cultivo e manipulação e a sua gama de hospedeiros (Whipps, 2001).

Nesses estudos os patógenos mais visados são *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* (Whipps, 2001).

##### 5.1. Modos de Ação Durante a Interação de Fungos e Fungos Fitopatogênicos na Espermosfera e Rizosfera

###### a) Competição

Existem relativamente poucos estudos envolvendo competição por nutrientes, espaços e sítios de infecção entre fungos na rizosfera e espermosfera (Whipps, 2001). Competição por carbono, nitrogênio e ferro pode ser mostrada como um mecanismo associado com o biocontrole ou supressão de espécies de *Fusarium* por espécies de *Fusarium* não patogênicas e *Trichoderma* (Mandeeel & Baker, 1991). Inúmeros estudos mostram que existe uma relação entre o aumento da colonização da rizosfera por fungos não patogênicos e a supressão de doenças radiculares. Já está bem estabelecido na literatura que formas não patogênicas de *Fusarium oxysporum* controlam formas patogênicas de *F. oxysporum* em uma variedade de culturas (Postma & Rattink, 1991). Para haver o sucesso, uma rápida produção de esporos é considerada um dos fatores primordiais no estabelecimento de agentes de controle de fitopatógenos de raízes (Douglas & Deacon, 1994).

Fungos micorrízicos também são fortes candidatos a agentes de controle pela competição por espaço, principalmente os ectomicorrízicos, visto que com a produção do manto ocupam o espaço físico de possíveis sítios de infecção. Entretanto apenas um trabalho de Marx (1972) demonstrou esse mecanismo. Atualmente o enfoque está voltado para a produção de antibióticos e indução de resistência (Whipps, 2001). Com relação aos fungos micorrízicos arbusculares, relatos sugerem que seu envolvimento em biocontrole esteja mais relacionado com indução de resistência do que com a competição *per se* (Mark & Cassells, 1996).

**Tabela 4.** Exemplos da interação fungo-fungo fitopatogênico estudados na espermosfera e rizosfera associados ao controle de doenças de plantas.

Antagonista	Patógeno	Planta hospedeira	Meio
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	pimentão e berinjela	solo esterilizado
<i>Fusarium spp.</i> (não patogênico)	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	pimentão e berinjela	solo esterilizado
<i>Fusarium oxysporum</i> (não patogênico)	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	tomate	solo esterilizado
<i>Fusarium solani</i> (não patogênico)	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	tomate	solo esterilizado
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i>	cravo	argila
<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	tomate	turfa/solo
<i>Pythium acanthophoron</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	cevada	areia
<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	cevada	areia
<i>Rhizoctonia solani</i> (binucleado, não patogênico)	<i>Phytophthora parasítica var. nicotianae</i>	tabaco	solo esterilizado
<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	berinjela	solo esterilizado
<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	berinjela	solo esterilizado
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	pimentão	turfa/areia
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	berinjela	solo esterilizado
<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	ervilha	Solo esterilizado

Fonte: Adaptado de Whipps (2001).

## b) Antibiose

Embora a produção de antibióticos por fungos envolvidos em biocontrole seja um fenômeno bastante documentado (Howell, 1998), existem poucos relatos demonstrando com clareza a produção de antibióticos por fungos na espermosfera e rizosfera (Whipps, 2001).

Os relatos mais comuns de fungos produzindo antibióticos referem-se a *Trichoderma/Gliocladium* (Howell, 1998) e *Talaromyces flavus* (Kim et al., 1990; Fravel & Roberts, 1991).

*Trichoderma (Gliocladium) virens* compreende os grupos P e Q, baseando-se no perfil da produção de antibióticos (Howell, 1999). Os isolados do grupo P produzem gliovirina, que é ativo contra *Pythium ultimum* e inativo contra *Rhizoctonia solani* AG-4, ao passo que os isolados do grupo Q produzem gliotoxina, que é ativo contra *Rhizoctonia solani* e inativo contra *Pythium ultimum*. A gliotoxina atua rompendo o citoplasma de *R. solani* (Harris & Lumsden, 1997).

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na rizosfera, catalisada pela oxidase de glicose de *Talaromyces flavus*, parece ser responsável pelo controle de *Verticillium dahliae* em berinjela (*Solanum tuberosum* L) (Stosz et al., 1996). A oxidase da glicose foi responsável pela supressão de *V. dahliae in vitro* e morte de microescleródios de *V. dahliae in vitro* e *in vivo* (Fravel & Roberts, 1991).

### c) Indução de resistência

Semelhantemente às bactérias, os fungos também são capazes de induzir resistência em plantas (Pascholati, 1998). Um grande número de fungos é capaz de realizar o controle por competição, antibiose e micoparasitismo (Whipps, 2001). Dentre esses há os saprófitas, como isolados não patogênicos de *Fusarium* (Larkin et al., 1996), espécies de *Trichoderma* (Yedidia et al., 1999), *Pythium oligandrum* (Rey et al., 1998), isolados não patogênicos binucleados de *Rhizoctonia* (Jabaji-Hare et al., 1999) e *Penicillium oxalicum* (de Cal et al., 1997), bem como fungos micorrízicos (Morandi, 1996).

Entretanto, nem todos esses estudos usaram um critério de separação espacial entre o agente fúngico e o patógeno desafiador para caracterizar a indução de resistência, restringindo a descrição do fenômeno a simples medições de alterações enzimáticas, proteínas PR ou caracterização da parede celular, possivelmente induzidas pela resistência sistêmica adquirida sem o envolvimento do patógeno (Volpin et al., 1995; Morandi, 1996). Espécies de *Trichoderma* produzem uma xilanase 22 kDa, que, quando injetada em tecidos vegetais, induz respostas de defesas tais como: acúmulo de K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup>, síntese de proteínas PR, biossíntese de etileno, glicosilação e acilação de fitoesteróis (Bailey & Lumsden, 1998). Entretanto, ainda não está elucidado se esse sistema pode ser ativado nas raízes quando expostas ao fungo (Whipps, 2001).

Desse modo, indução de resistência por fungos e até mesmo bactérias na rizosfera ainda carece de estudos mais aprofundados, visto que os resultados obtidos até o momento não são totalmente conclusivos.

### d) Micoparasitismo

Existem inúmeros exemplos na literatura da capacidade de fungos em parasitar esporos, escleródios, hifas e outras estruturas fúngicas e muitos deles estão ligadas ao controle de doenças (Davanlou et al., 1999). Entretanto essas observações foram efetuadas *in vitro* ou em sistemas esterilizados (Benhamou et al., 1999) e exemplos claros de micoparasitismo na espermosfera e rizosfera são raros (Lo et al., 1998).

Os processos ligados ao micoparasitismo envolvem receptividade do hospedeiro, seguida do crescimento direcionado, contato, reconhecimento, adesão e

penetração (Whipps, 2001). Embora nem todos desses aspectos ocorram em todas as interações fungo-fungo, o fator chave é a transferência de nutrientes do hospedeiro para o micoparasita. Diversas substâncias podem estar envolvidas no reconhecimento entre o hospedeiro e o micoparasita, dentre as quais incluem-se as lectinas e alguns tipos de carboidratos. Pouco se sabe acerca do processo de reconhecimento entre o hospedeiro e o micoparasita; entretanto a primeira evidência de que o sinal é traduzido por uma proteína heterotrimérica G e mediado por cAMP foi constatada em *Trichoderma harzianum* (Omero et al., 1999).

A penetração via degradação da parede celular é frequentemente observada durante o micoparasitismo, e grande ênfase está sendo dada na caracterização e clonagem de enzimas extracelulares, tais como  $\beta$ -1,3 glucanases, quitinases, celulases e proteases produzidas por agentes fúngicos de controle (Deane et al., 1998).

Esses relatos refletem as diferenças entre isolados fúngicos e as plantas utilizadas na experimentação e claramente demonstram a complexidade das interações que ocorrem tanto na espermosfera quanto na rizosfera (Whipps, 2001). Desse modo, no estudo desses dois sistemas para uma possível utilização de produtos comerciais deve-se ter em mente que as interações são múltiplas e que a aplicação de misturas de produtos com diferentes combinações de isolados ou espécies deve ser considerada (de Boer et al., 1999).

## Referências

- ADIKO, A.; GOWEN, S.R. Comparison of two inoculation methods of root-knot nematodes for the assessment of the biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*. **Afro-Asian Journal of Nematology**, v.4, p.32-4, 1994.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4<sup>th</sup> ed. London: Academic Press, 1997. 635p.
- BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.
- BAILEY, D.J.; LUMSDEN, R.D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.) **Trichoderma and Gliocladium**, vol. 2. **Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 1998.p.185-204.
- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.2, p.99-109, 1999.
- BROWN, S.M.; NORDMEYER, D. Synergistic reduction in root galling by *Meloidogyne javanica* with *Pasteuria penetrans* and nematicides. **Journal Nematology**, v.11,p.75-81, 1985.
- BUYSENS, S.; HEUNGENS, K.; POPPE, J.; HOFTE, M. Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.865-71, 1996.



CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Induced systemic resistance (ISR) by *Pseudomonas* spp. impairs pre and pos-infection development of *Pythium aphanidermartum* in cucumber roots. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.877-86, 1998.

CHERNIN, L.; ISMAILOV, Z.; HARAN, S.; CHET, I. Chitinolytic Enterobacter agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1720-1726, 1995.

CIANCIO, A. Phenotypic adaptation in *Pasteuria* spp. and nematode parasites. **Journal of Nematology**, v.24, p.29-35, 1995.

CLARK, F.E. Bacteria in soil. In: EURGES, A.; RAW, F. (eds.) **Soil Biology**, London: Academic Press, 1967, p.15-19.

Da LUZ, W.C.; BERGSTROM, G.C.; STOCKWELL, C.A. Seed applied bioprotectants for control of seed-borne *Pyrenophora tritici-repentis* and agronomic enhancement of wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, p.384-86, 1998.

DAVANLOU, M.; MADSEN, A.M.; MADSEN, C.H.; HOCKENHULL, J. Parasitism of macroconidia, chlamydospores and hyphae of *Fusarium culmorum* by mycoparasitic *Pythium* species. **Plant Pathology**, v.48, p.352-59, 1999.

De BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-10, 1999.

De CAL, A.; PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. **Plant Pathology**, v.46, p.72-9, 1997.

DEANE, E.E.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M.; PEBERDY, J.F. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p.101-110, 1998.

DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: M. JUNIOR (ed.), **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.92-127.

DOUGLAS, L.I.; DEACON, J.W. Strain variation in tolerance of water stress by *Idriella* (*Microdochium*) *bolleyi*, a biocontrol agent of cereal root and stem base pathogens. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.239-49, 1994.

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. Environment factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2429-2438, 1999.

DUNNE, C.; CROWLEY, J.J.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DOWLING, D.N.; De BRUIJN, F.J.; O'GARA, F. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. **Microbiology**, v.143, p.3921-31, 1997.

DUTKY, E.M.; SAYRE, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, v.10, p.285, 1978.

ELTARABILY, K.A.; HARDY, G.K.; HUSSEIN, A.M.; KURTBOKE, D.I. The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. **New Phytologist**, v.137, p.495-507, 1997.

- FRAVEL, D.R.; ROBERTS, D.P. In situ evidence for the role of glucose oxidase in the biocontrol of *Verticillium* wilt by *Talaromyces flavus*. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.91-99, 1991.
- FREDRICKSON, A.G.; STEPHANOPOULOS, G. **Microbial competition**. *Science*, v.231, p.972-79, 1981.
- GOSTTSCHAL, J.C. Phenotypic response to environmental changes. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.74, p.93-102, 1990.
- GRISI, B.M.; GRAY, T.R.G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP pata estimar a biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.109-115, 1986.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced resistance: how do induced plant stop pathogens ? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.
- HAMMERSCHMIDT,R.;LAMPOR,T.D.T.A.;MULDOON,E.P. Cell hydroproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to *Cladosporium cucumerinum*. **Physiology and Plant pathology**, v.24, p.43-47, 1984.
- HARRIS,.A.R.; LUMSDEN, R.D. Interactions of *Gliocladium virens* with *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* in non sterile potting medium. **Biocontrol Science and Technology**, v.7, p.37-47, 1997.
- HOLLIS, J.P.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fatty acids in Louisiana rice fields. **Phytopathology**, v.56, p.841-47, 1967.
- HOMECHIN, M. Controle biológico de patógenos do solo. In: BETTIOL, W. (ed.) **Controle biológico de plantas**. Jaguariúna:EMPBRAPA, 1991. cap.9, p.135-156.
- HOWELL, C.R. The role of antibiotics in biocontrol. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (eds.) *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. **Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 1998. p.173-184.
- HOWELL, C.R. Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. **Mycologia**, v.91, p.930-34, 1999.
- JABAHI-HARE, S.; CHAMBERLAND, H.; CHAREST, P.M. Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from *Rhizoctonia* stem canker by a binucleate *Rhizoctonia* isolate. **Mycological Research**, v.103, p.1035-43, 1999.
- JACOBS, A.K.; DRY, I.B.; ROBINSON, S.P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethefon. **Plant Pathology**, v. 48, p. 325-336, 1999.
- JATALA, P. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Reviews in **Phytopathology**, v.24, p.453-489, 1986.
- KANG, Y.;CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M.A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3939-47, 1998.

KELL, C.; DÉFAGO, G. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: GANGE, A.C.; BROWN, V.K. (Ed.) **Multitrophic interactions in terrestrial system**. Oxford: Blackwell Science, 1997. p.27-47.

KHMEL, I.A.; SOROKINA, T.A.; LEMANOVA, N.B.; LIPASOVA, V.A.; METLISKI, O.Z.; MURDEINAYA, T.V.; CHERNIN, L.S. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.45-57, 1998.

KIM, K.K.; FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. Production, purification and properties of glucose oxidase from the biocontrol fungus *Talaromyces flavus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.199-205, 1990.

KNOESTER, M.; PIETERSE, C.M.J.; BOL, J.F.; VAN LOON, L. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n.8, p.720-727, 1999.

KOZOLOWISKI, G.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n.1, p. 53-58, 1999.

KRAUS, J.; LOPER, J.E. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.849-54, 1995.

KUC, J.; RUSH, J.S. Phytoalexin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.236, p.455-473, 1985.

KUNC, F. Methods for analysis of soil microbial communities. In: Ritz, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E. (Ed.) **Beyond the biomass**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p.23-8.

LARKIN, R.P.; HOPKIBNS, D.L.; MARTIN, F.N. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology**, v.86, p.812-19, 1996.

LAWTON, M.A.; LAMB, C.J. Transcriptional activation of plant defence genes by fungal elicitors, wounding and infection. **Molecular and Cellular Biology**, v.335, p.335-341, 1987.

LEEMAN, M.; DEN OUDEN, F.M.; VAN PELT, J.A.; DIRKX, F.P.M.; STEIJL, H.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.86, p.149-55, 1996.

LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.85, p.1021-27, 1985.

LOC, T.; NELSON, E.B.; HAYES, C.K.; HARMAN, G.E. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. **Phytopathology**, v.88, p.129-36, 1998.

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5357-63, 1999.

- MAHESWARI, T.U.; MANI, A.; RAO, P.K. Combined efficacy of bacterial spore parasite, *Pasteuria penetrans* (Thorne 1940) and nematicides in the control of *M. Javanica* on tomato. **Journal of Biological Control**, v.1, p.53-57, 1987.
- MANDEEL, Q.; BAKER, R. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt on cucumber with strains of non pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.81, p.462-69, 1991.
- MANKAU, R.; PRASAD, N. Possibilities and problems in the use of a sporozoan endoparasitic nematode. **Journal of Invertebrate pathology**, v.26, p.333-39, 1972.
- MARILLEY, L.; ARAGNO, M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perene* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.127-36, 1999.
- MARK, G.L.; CASSELS, A.C. Genotype-dependence in the interaction between *Glomus fistulosum*, *Phytophthora fragariae* and the wild strawberry (*Fragaria vesca*). **Plant and Soil**, v.185, p.233-39, 1996.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review of Phytopathology**, v.10, p.429-54, 1972.
- MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, v.82, p.535-540, 1998.
- McCLURE, N.C.; AHMADI, A.R.; CLARE, B.G. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K-84: a study of factors involved in biological control crown gall disease. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3977-82, 1998.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de plantas**. Jaguariúna:EMPBRAPA, 1991. cap.9, p.135-156.
- NARISAWA, K.; OHKI, K.T.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot and *Verticillium yellows* in chinese cabbage in the field by root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, v.49, p.141-46, 2000.
- NARISAWA, K.; TOKUMASU, S.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot formation in chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, v.47, p.206-10, 1998.
- NEENO-ECKWALL, E.C.; SCHOTTEL, J.L. Occurrence of antibiotic resistance in the biological control of potato scab disease. **Biological Control**, v.16, p.199-208, 1999.
- NELSON, E.B.; CHAO, W.-L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off. **Phytopathology**, v.76, p.327-35, 1986.
- NOWAK -THOMPSON, B.; CHANEY, N.; WING, J.S.; GOULD, S.J.; LOPER, J.E. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.2166-74, 1999.

OMERO, C.; INBAR, J.; ROCHA-RAMIRA, V.; HERRERA-ESTRELA, A.; CHET, I.; HORWITZ, B.A. G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v.103, p.1637-42, 1999.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the Southeastern United States. **Journal of Nematology**, v.22, p.525-531, 1990.

PASCHOLATI, S.F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Piracicaba, 1998. 123 p. (Livre-Docência - ESALQ/USP).

PEÑALVER, R.; VICEDO, B.; SALCED, C.I.; LOPEZ, M.M. *Agrobacterium radiobacter* strains K-84, K1026 Agr<sup>-</sup> produce an antibiotic-like substance active in vitro against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.259-67, 1994.

PIERSON III, L.S.P.; PIERSON, E.A. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. **FEMS Microbiology Letters**, 136, p.101-08, 1996

PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology**, v.84, p.940-47, 1994.

POSTMA, J.; RATTINK, H. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with non pathogenic *Fusarium* isolates. **Mededelingen Faculteit Landbouwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v.56, p.179-83, 1991.

RANDHAWA, P.S.; SCHAAD, N.W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, v.75, p.254-259, 1985.

RATNASOMA, H.A.; GOWEN, S.R. Studies on the spore size of *Pasteuria penetrans* and its significance in the spore attachment process of *Meloidogyne* spp. **Afro-Asian Journal of Nematology**, v.1, p.51-56, 1991.

RODRIGUEZ-KABANA, R. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. **Journal of Nematology**, v.18, p.524-26, 1986.

RYAN, A.D.; KINKEL, L.L. Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biocontrol of potato scab. **Biological Control**, v.10, p.180-86, 1997.

SAYRE, R.M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. **Journal of Nematology**, v.12, p.260-70, 1980.

SAYRE, R.M.; WALTER, D.E. Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.29, p.149-166, 1991.

SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.1091-1101, 1977.

SAYRE, R.M.; STARR, M.P. *Pasteuria penetrans* - mycelial and endospore-forming bacterium parasite in plant nematodes. **Proceedings of the Heminth. Society**, Washington, p.149-65, 1985.

- SCHROTH, N.M.; HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.
- SHARMA, S.B.; DAVIES, K. Characterisation of *Pasteuria* isolates from *Heterodera cajani* using morphology, pathology and serology of endospores. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.106-112, 1996.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology**, v.58, p.229-239, 1996.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v.69, p.167-179, 1999.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Management of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by fungus culture filtrates and *Bacillus subtilis* on Chickpea. **Fundamental Applied Nematology**, v.18, p.71-76, 1995.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination on Chickpea. **Fundamental Applied Nematology**, v.16, p.215-18, 1993.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F. M. de S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.142p.
- SIKORA, R.A.; RACKE, J.; BODENSTEIN, F. Influence of plant health promotion rhizobacteria antagonistic to *Globodera pallida* and *Heterodera schachii* on soil borne fungal and bacteria plant pathogens of potato and sugarbeet. **Journal of Nematology**, v.21, p.588, 1989.
- STARR, M.P.; SAYRE, R.M. *Pasteuria thornei* sp. nov. and *Pasteuria penetrans* sensu stricto emend, mycelial and endospore forming bacteria parasitic respectively on plant parasitic of genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. **Annales de l'Institut Pasteur Microbiology**, v.139, p.11-31, 1988.
- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, v.74, p.55-60, 1984.
- STIRLING, G.R.; WACHTEL, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, v.26, p.208-312, 1990.
- STOSZ, S.K.; FRAVEL, D.R.; ROBERTS, D.P. *In vitro* analysis of the role of glucose oxidase from *Talaromyces flavus* in biocontrol of the plant pathogen *Verticillium dahliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3183-86, 1996.
- STURHAN, D. New host and geographical records of nematode parasitic bacteria of the *Pasteuria penetrans* group. **Nematologica**, v.34, p.350-56, 1988.
- TOKESHI, H. Doenças e pragas agrícolas geradas e multiplicadas pelos agrotóxicos. **Fitopatologia brasileira**, v.25 (Suplemento), p.264-70, 2000.
- VANCURA, V.; KUNC, F. Soil microbial associations: **control of structures and functions**. Amsterdam:Elsevier, 1988. 405p.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n.9, p.753-765, 1997.

VICEDO, B.; LOPEZ, M.J.; ASINS, M.J.; LOPEZ, M.M. Spontaneous transfer of Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the nopaline catabolism plasmid of *A. Radiobacter* strain K84 in crow gall tissue. **Phytopathology**, v.86, p.528-34, 1996.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D.A.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. **Plant Physiology**, v.108, p.1449-54, 1995.

WALKER, C.E.; WACHTEL, M.F. The influence of soil solarisation and non-fumigant nematicides on infection of *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, v.34, p.477-483, 1988.

WEI, G.; KLOPPER, J.W.; TUZUM, S. Induced systemic resistance of cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p.221-24, 1996.

WELLER, D.M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere bacteria. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.

WELLER, D.M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.26, p.370-407, 1988.

WELLER, D.M.; ZHANG, B.X.; COOK, R.J. Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. **Plant Disease**, v.68, p.710-713, 1985.

WHIPPS, J.M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.1-134, 1997a.

WHIPPS, J.M. Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne pathogens diseases. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, M.H. (eds.) **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997b. p.525-46.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

XU, G.W.; GROSS, D.C. Field evaluation of the interactions among fluorescent pseudomonads and potato yields. **Phytopathology**, v.76, p.423-30, 1986.

# Capítulo 14

## Microbiota da Solo como Indicadora da Poluição do Solo e do Ambiente

Paulo FORTES NETO <sup>(1)</sup>, Silvana Aparecida Pavan FERNANDES <sup>(2)</sup> e Marcelo Cabral JAHNEL <sup>(3)</sup>

### 1. Introdução

A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade contínua do solo de aceitar, estocar e reciclar água, nutrientes e energia, bem como reter, dispersar e transformar materiais químicos e biológicos, funcionando como um tampão ou filtro ambiental. A qualidade de qualquer solo depende da sua natureza, que é função dos fatores de formação e da interferência antrópica relacionada ao uso e manejo (Gregorich et al., 1994). A Sociedade Americana de Ciência do Solo definiu qualidade do solo como a capacidade de um tipo específico de solo de funcionar dentro dos limites do ecossistema natural ou manejado, de forma a sustentar a produtividade agrícola, manter a qualidade do ambiente, promover a saúde das plantas e animais, manter ou aumentar a qualidade do ar e da água e dar suporte à saúde e habitação do homem (Andréa, 2000).

A qualidade do solo está relacionada à atividade microbiana, ou seja, a reações biológicas e bioquímicas catalisadas pelos microrganismos. Essas reações são responsáveis pela decomposição de resíduos de plantas, animais, urbanos e industriais, pela ciclagem biogeoquímica, incluindo a fixação de N<sub>2</sub>, pela formação de agregados do solo e pela taxa de decomposição de materiais orgânicos (Elsas, 1997). Devido a essas características, os microrganismos do solo são considerados como indicadores sensíveis para avaliar o impacto antropogênico sobre os processos biológicos do solo (Dick, 1994; Doran & Parkinson, 1994; Turco et al., 1994).

---

<sup>(1)</sup> Professor, Universidade de Taubaté, Departamento de Ciências Agrárias, Estrada Municipal Dr. José Luis Cembranelli, 5000 - Fazenda Piloto - Itaim, Cep - 12081-010, Taubaté, SP. E-mail: paulo.fortes@unitau.br;

<sup>(2)</sup> Pós-doutoranda, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP, Caixa Postal-9, 13418-900, Piracicaba, SP.

<sup>(3)</sup> Professor, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Curso de Agronomia, BR 376 km 14, Costeira, CEP-83010-500, São José dos Pinhais, PR. E-mail: marcelo.jahnel@pucpr.br



Os estudos referentes ao uso de parâmetros microbianos como indicadores de poluição do solo e do ambiente têm sido desenvolvidos com o objetivo de verificar a ação dos elementos contaminantes, provenientes de fertilizantes, pesticidas, resíduos orgânicos e do manejo do solo sobre a comunidade e a atividade microbianas do solo (Fliessbach, et al. 1994; Fernandes, 1999; Fortes Neto, 2000, Fernandes & Bettiol, 2003).

A utilização de medidas microbiológicas para indicar a qualidade do solo vem sendo pesquisada porque os microrganismos mantêm uma íntima relação com as propriedades químicas e físicas do solo e também porque são responsáveis por inúmeros processos biológicos e bioquímicos, sendo, por isso, sensíveis às alterações de origens naturais e antropogênicas que ocorrem no solo. Entretanto, apesar dessa característica dos microrganismos, há vários critérios básicos para que um parâmetro microbiano possa ser considerado como indicador ideal para avaliar as alterações resultantes do manejo dado ao solo (Brookes, 1995; Giller et al., 1998; Marchiori Júnior & Melo, 1999; Trasar-Cepeda et al., 2000; Obbard, 2001).

## 2. Parâmetros Microbianos

De acordo com Brookes (1995), o parâmetro microbiano deve apresentar as seguintes características: (1) ser mensurável de forma acurada; (2) ser testado em uma variedade de tipos e condições de solo; (3) ser sensível à ação do agente em estudo; e (4) apresentar validade científica confiável.

Os parâmetros microbianos sensíveis às variações provocadas no solo pelos elementos poluidores são divididos em três grupos: 1- o que mede a atividade microbiana global; 2- o que determina o tamanho da população de um organismo ou da comunidade de um grupo funcional; 3- o que correlaciona a atividade com a comunidade microbiana predominante no solo (Brookes, 1995; Obbard, 2001).

As análises microbiológicas são úteis na avaliação da qualidade do solo; porém, vários autores relatam a necessidade de se utilizarem diversas análises ao mesmo tempo, para se ter uma noção mais precisa das interferências ocasionadas pelos agentes poluentes no solo (Turco et al., 1994; Brookes, 1995; Jahnel, 1997; Melo & Marques, 2000; Obbard, 2001).

Nos estudos para determinar os efeitos dos agentes contaminantes e do manejo do solo sobre a atividade e a dinâmica da comunidade microbiana, as análises mais utilizadas como indicadores são: liberação de CO<sub>2</sub> pela respiração microbiana, mineralização de nitrogênio e carbono, fixação biológica do nitrogênio, atividades enzimáticas, contagem de grupos microbianos e biomassa microbiana de C, N, P e S (Jahnel, 1997; Melo & Marques, 2000; Fortes Neto, 2000; Fernandes & Bettiol, 2003). Recentemente, também, os métodos moleculares de extração de DNA do solo e a análise de fosfolípidios estão sendo utilizados na obtenção de indicadores para avaliação do impacto ocasionado pela presença de agentes poluentes no solo (Torsvik et al., 1998; Macnaughton et al., 1999).

Deve-se considerar que uma mesma atividade pode ser realizada por diferentes tipos de microrganismos (como, por exemplo, a amonificação), de tal modo que o efeito negativo sobre uma determinada comunidade pode ser compensado por um efeito positivo sobre outra que exerça o mesmo tipo de transformação da matéria orgânica (Melo & Marques, 2000)

Estudos integrados das atividades microbianas poderão fornecer dados importantes para a elaboração de índices de qualidade biológica do solo, necessários para diagnosticar e monitorar impactos ambientais sobre a microbiota do solo (Campbell et al. 1992; Turco et al., 1994; Brookes, 1995; Obbard, 2001).

### **3. Medidas Microbiológicas do Solo**

#### **3.1 Biomassa Microbiana**

Um das medidas microbiológicas mais usadas em estudos de impacto ambiental sobre a microbiota do solo é a quantificação da biomassa microbiana do solo. É considerada tanto um agente de transformação, pelo qual passam todos os materiais orgânicos adicionados ao solo, quanto um reservatório de nutrientes, sendo o seu estudo de grande importância em sistemas de manejo do solo, uma vez que influi na dinâmica dos nutrientes e na fertilidade do solo (Brookes, 1995). Dentro desse contexto, a biomassa microbiana é considerada um parâmetro indicador da qualidade do solo, pois o seu acompanhamento reflete as modificações que ocorrem como resultado do preparo e da aplicação de resíduos orgânicos no solo (Chander & Brookes, 1993; Turco et al., 1994; Karlem et al., 1997; Balota et al., 1998).

A biomassa microbiana do solo pode ser determinada por meio de métodos de microscopia direta, fumigação-incubação e fumigação-extração (Jenkinson & Powlson, 1976; Brookes & McGrath, 1984).

A microscopia direta é o método mais antigo utilizado na avaliação da biomassa microbiana e, embora tenha sido substituída por outros métodos, pode fornecer informações úteis sobre a natureza e a composição da microbiota do solo. As principais desvantagens são o tempo maior necessário para a análise, o treinamento técnico necessário para proceder à separação visual dos componentes microbianos de outros materiais e o uso de diversos fatores de conversão (Wardle & Parkinson, 1990). Na microscopia direta, as biomassas de bactérias e fungos devem ser analisadas separadamente.

O método de fumigação-incubação apresenta a vantagem de permitir a obtenção de resultados referentes à taxa de respiração do solo e, ao mesmo tempo, de estimar a biomassa microbiana pela diferença de emissão de CO<sub>2</sub> entre amostras de solo não fumigadas e fumigadas. Entretanto, esse método tem limitação, como a de não ser aplicável em condições de solos ácidos, ou encharcados ou com adição recente de resíduos orgânicos (Jenkinson & Powlson, 1976; Ocio & Brookes, 1990). Nesse caso, o método de fumigação-extração é mais indicado, porque o carbono, proveniente da comunidade microbiana morta, é determinado por extração química.

Evitam-se, assim, os problemas associados ao período de incubação, tais como inibição do desenvolvimento microbiano pela acidez do solo, variação da umidade e da temperatura, imobilização de nitrogênio e desnitrificação, que interferem na liberação do CO<sub>2</sub> durante a incubação. Por isso, o método de fumigação-extração pode ser aplicado a uma grande variedade de solos, inclusive àqueles com baixo pH, alto teor de matéria orgânica fresca e baixo teor de umidade (Brookes & McGrath, 1984; Feigl et al., 1995).

As medidas de biomassa microbiana certamente têm suas limitações para avaliar a qualidade do solo, uma vez que não permitem a avaliação das alterações na estrutura da comunidade microbiana, por exemplo, as mudanças que ocorrem na dinâmica das populações de fungos e bactérias no solo. No entanto, esse parâmetro, quando comparado a outros mais sensíveis para determinar o nível de degradação do solo, tem-se revelado muito mais preciso para indicar as mudanças iniciais no conteúdo de matéria orgânica do solo (Powlson et al., 1987; Brookes, 1995).

### 3.2 Respiração da Microbiota

A respirometria é um método que determina a quantidade de carbono liberado na forma de CO<sub>2</sub>, resultante da decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana quimiorganotrófica aeróbia do solo. Permite quantificar o carbono que está sendo degradado no solo e também verificar se as condições climáticas, o manejo do solo e a presença de elementos poluentes estão ou não comprometendo a atividade microbiana durante a decomposição e a mineralização do carbono no solo.

A liberação de CO<sub>2</sub> é um método que, quando utilizado sob condições controladas de umidade (40-50% da capacidade de campo) e temperatura (15-25 °C), fornece resultados confiáveis a respeito de poluição do solo (Jenkinson & Powlson, 1976). Entretanto, durante a aplicação do método, deve-se verificar se a emissão do CO<sub>2</sub> reflete as variações proporcionadas pelo ambiente (umidade e temperatura) ou de agentes poluentes sobre a comunidade microbiana do solo (Brookes, 1995). Isso porque, quando a respiração microbiana é determinada em amostras de solo coletadas no campo, essas amostras estão sob a influência das condições climáticas do momento da coleta, o que poderá proporcionar acentuadas variações nos resultados (Brookes, 1995). Estudos realizados por Cook & Graves (1987) mostram essa flutuação ou variação de ordem natural. Nesse estudo, a liberação de CO<sub>2</sub> no solo foi monitorada diretamente em uma área no campo durante 52 semanas. A liberação do CO<sub>2</sub> foi máxima, com aproximadamente 950 mg de CO<sub>2</sub> cm<sup>-3</sup> de solo no verão, quando a temperatura foi bastante elevada; mas depois declinou para menos que a metade quando a condição climática predominante foi de inverno, com baixa temperatura. A influência da variação sazonal sobre a emissão de CO<sub>2</sub> do solo em condição de campo também foi verificada por Burke et al. (1995) e Trasar-Cepeda et al. (2000).

No Brasil, Cattelan & Vidor (1990) e Balota et al. (1998) avaliaram a atividade microbiana do solo submetido a sistemas de preparo e sucessão de culturas e verificaram que as amostras de solo obtidas no inverno apresentaram menor atividade respiratória basal que as do verão, porque nesta estação a temperatura varia dentro de uma faixa considerada adequada para a maioria dos microrganismos do solo.

### 3.3 Quantificação de Microrganismos

A contagem de microrganismos no solo é uma medida que poderá ser obtida diretamente por microscopia ou estimada por métodos indiretos, quando os propágulos existentes na amostra são capazes de formar colônias. Em todos os procedimentos de isolamento, os microrganismos são obtidos em condições naturais e colocados em condições artificiais. Dessa maneira, em qualquer que seja o método empregado, haverá seleção dos microrganismos, seja pelo meio de cultura utilizado ou pelas condições ambientais do cultivo. Geralmente, a contagem de microrganismos do solo é realizada pela técnica de plaqueamento em meio de cultura. Esse procedimento detecta um número menor de espécies de microrganismos que ocorre naturalmente no solo, pois favorece o crescimento de um pequeno grupo de espécies de metabolismo rápido e adaptadas a sobreviver em solo relativamente deficiente em nutrientes (Brookes & McGrath, 1984; Jahnelt 1997; Elsas, 1997).

### 3.4 Atividade Enzimática

A atividade enzimática é importante porque está relacionada a inúmeras reações necessárias para a vida microbiana no solo, como decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e estruturação do solo, constituindo-se dessa forma, em um indicador sensível para ser utilizado na avaliação da qualidade do solo (Dick, 1994; Elsas, 1997; Fernandes, 1999).

A determinação da atividade enzimática no solo pode ser realizada pela avaliação das atividades de enzimas específicas ou pelo estudo das taxas de transformação de substratos adicionados ao solo. Os métodos para a determinação da atividade enzimática em amostras de solo envolvem a adição de um substrato adequado e a incubação, por um determinado tempo, seguindo-se a quantificação do produto da transformação do substrato ou da quantidade do produto remanescente na amostra (Elsas, 1997). Alguns cuidados devem ser tomados em relação a: manutenção das características do local de amostragem do solo; obtenção, preparo e armazenamento das amostras; inibição da atividade microbiana; concentração do substrato, pH do meio e tempo de incubação das amostras ( Dick, 1994; Elsas, 1997; Fernandes, 1999).

## 4. Alguns Agentes Poluentes e a Microbiota do Solo

### 4.1 Pesticidas

O impacto desses produtos sobre o meio ambiente é assunto polêmico e amplamente debatido por toda a sociedade e comunidade científica. Seus impactos sobre a microbiota do solo e os processos biológicos são dificilmente determinados com precisão, devido à natureza, heterogeneidade, dinâmica e respostas adaptativas da comunidade microbiana (Siqueira, 1988; Mafra & Miklós, 1998a).

A rápida biodegradabilidade é um dos principais atributos para que um produto não seja poluente. Entretanto, quando sua dissipação é lenta, há acumulação no ambiente, alterando o equilíbrio natural do ecossistema, podendo entrar na cadeia alimentar. Assim, os pesticidas podem ser classificados quanto a sua meia vida em: biodegradáveis, aqueles que possuem meia vida menor que 3 semanas (2,4-D, Paration, Timet); moderadamente persistentes, com meia vida entre 3 semanas à 12 meses (Dalapon, Atrazina); e persistentes ou recalcitrantes, com meia vida superior a um ano (maioria dos hidrocarbonetos clorados, como DDT e Toxafeno) (Mafra & Miklós, 1998a; Dellamatrice, 2000).

O pesticida ideal é aquele que ao ser aplicado cumpra seu objetivo e seja degradado rapidamente a produtos de ocorrência comum no meio ambiente, como CO<sub>2</sub>, água, produtos orgânicos e inorgânicos mais simples. Uma ampla faixa de microrganismos é capaz de utilizar pesticidas como substratos para crescimento, promovendo sua decomposição no solo. Exemplos de gêneros de microrganismos com capacidade de transformar ou degradar pesticidas é apresentado na tabela 1. Esses microrganismos promovem alterações químicas diversas, que são mediadas por enzimas, e variam de simples transformações, como a remoção de átomos da molécula, até a sua mineralização completa (Siqueira, 1988; Dellamatrice, 2000).

**Tabela 1.** Gêneros de microrganismos heterotróficos do solo com espécies aptas a degradar pesticidas (baseado em Alexander, 1977 e Siqueira, 1988).

Microrganismos	Gêneros com espécies de ação comprovada
Bactérias	<i>Agrobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Flavibacterium, Klebsiella, Pseudomonas, Xanthomonas, Achromobacter, Rhodotorula, Aerobacter, Hydrogenomonas e Brevibacterium</i>
Fungos	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Glomerella, Mucor, Penicillium, Rhizoctonia e Trichoderma</i>
Actinomicetos	<i>Micromonospora, Nocardia e Streptomyces</i>
Algas e protozoários	Podem modificar, mas não usam os pesticidas como substrato; portanto, não os decompõem.

Os efeitos negativos dos pesticidas devem ser avaliados por indicadores específicos, como a taxa de mineralização, nitrificação e atividade enzimática, considerando sua magnitude, duração e persistência, sendo considerados críticos, ou potencialmente perigosos, aqueles efeitos com duração superior a 60 dias. Utilizando-se desse conceito, especialistas alemães verificaram que em apenas 2% dos 734 experimentos analisados, os pesticidas seriam considerados críticos, com possível impacto sobre o ambiente (Siqueira, 1988). Embora esse resultado deva ser interpretado com cuidado, indica que a aplicação de pesticidas específicos, em doses recomendadas, não parece resultar em efeitos deletérios aos microrganismos não alvos e aos processos microbiológicos do solo (Siqueira, 1988; Ostiz, 1991; Mafra & Miklós, 1998a; Dellamatrice, 2000).

A transformação ou degradação dos pesticidas no solo ocorrem em função de várias reações bióticas e abióticas que compreendem: reações primárias (oxidação, redução, hidrólise) e secundárias (conjugações e reações com constituintes do solo),

sendo que o grau de persistência é influenciado pelas condições ambientais (temperatura, umidade, profundidade do solo, aeração, etc), presença de outros pesticidas e características químicas da própria molécula. A degradação pode levar à formação de outro composto secundário ou à mineralização com a formação de produtos simples como CO<sub>2</sub>, água e substâncias inorgânicas pela degradação completa da substância. A eficiência na transformação de um produto com a produção de CO<sub>2</sub> e biomassa depende da espécie, composto químico, concentração do composto e fatores ambientais (Mafra & Miklós, 1998a; Dellamatrice, 2000).

Outro tipo de transformação, chamada co-metabolismo, ocorre com alterações na molécula sem que esta seja utilizada como fonte de energia pelos microrganismos, que não têm suas populações aumentadas. Utilizam uma segunda fonte de energia para crescimento. Geralmente ocorre degradação incompleta da molécula com produção de metabólitos, por reações como hidrólise, substituição ou oxidação. Esses metabólitos podem ser degradados por outros microrganismos ou se acumularem no ambiente (Dellamatrice, 2000).

Desse modo, a desativação de um determinado produto tóxico no solo pode consistir de uma simples reação, que causa a sua desintoxicação, a uma seqüência de transformações, envolvendo mecanismos diversos, que promovem sua degradação ou mineralização completa. O DDT é considerado recalcitrante na natureza, mas vários organismos possuem enzimas capazes de degradá-lo, embora vagarosamente. Já o herbicida 2,4-D é facilmente decomposto por microrganismos que, por transformações diversas, retiram energia para o crescimento e transformam os constituintes orgânicos em minerais simples (Siqueira, 1988; Ostiz, 1991; Mafra & Miklós, 1998a; Dellamatrice, 2000).

Os parâmetros microbiológicos mais utilizados para avaliar o impacto dos pesticidas na microbiota do solo estão apresentados na tabela 2. Verifica-se que a composição química do produto é responsável pelo favorecimento seletivo de enzimas e de grupos microbianos no solo e que a determinação de CO<sub>2</sub> liberado do solo com pesticida radiomarcado é a medida mais utilizada na pesquisa de biodegradação (Monteiro, 2001).

## 4.2 Fertilizantes

Os fertilizantes minerais e o calcário favorecem o desenvolvimento seletivo de microrganismos de forma direta, pela mudança do pH e disponibilização de nutrientes às células dos microrganismos, e de forma indireta pela maior produção vegetal, que acarreta um aumento da atividade rizosférica (Cattelan & Vidor, 1990).

O nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre, existentes na composição dos fertilizantes, e do cálcio, no calcário, são componentes essenciais para os microrganismos e por isso tendem a influenciar o crescimento e a atividade da comunidade microbiana, influenciando, em conseqüência, inúmeros processos metabólicos importantes nas transformações desses elementos no solo e também na mineralização da matéria orgânica (Mafra & Miklós, 1998b). Convém ressaltar que o aumento da atividade microbiana de um solo em resposta à adição de nutrientes minerais está diretamente relacionado com as suas características químicas naturais.

**Tabela 2.** Parâmetros microbianos utilizadas para avaliar o impacto de pesticidas na microbiota do solo.

Medidas microbiológicas	Produtos	Referências
Liberção CO <sub>2</sub>	Ametrina, Atrazina, Metolaclor, Hexaclorobenzeno, Pentaclorofenol	Costa (1992), Monteiro et al (1995), Barros (1998), Silva (1999), Monteiro et al (1999), Peixoto, et al (2000), Langerbach (2000), Brockelmann (2001)
Contagem de microrganismos	Propanil, Atrazina, Carbendazin, Diuron, Carbetamida, Metolaclor	Brigante (1995), Spessoto (1996), Monteiro et al (1996), Silva (1996), Esposito, et al (1998), Sanyal & Kulshrestha (1999), Roque (2000), Hole, et al (2001)
Atividades enzimáticas	Endossulfan, Aldicarbe	Santos & Monteiro (1994)

A adição de fertilizantes nitrogenados tende a inibir o desenvolvimento da simbiose entre os microrganismos fixadores de nitrogênio e as leguminosas, devido à pronta disponibilidade de nitrogênio para as plantas. No entanto, a aplicação de nitrogênio estimula a comunidade de microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica no solo. A esse respeito, Della Bruna, et al. (1991), estudando a atividade da microbiota em solos tratados com 50 mg kg<sup>-1</sup> de úreia, 300 mg kg<sup>-1</sup> de fosfato monobásico e uma mistura de CaCO<sub>3</sub> + MgO (3:1), constataram que a adição desses elementos minerais estimulou a atividade dos microrganismos do solo, resultando assim, em um aumento de 34% no desprendimento de C-CO<sub>2</sub> em relação ao solo sem a adição dos fertilizantes. Resultados similares também foram obtidos por Minihoni et al. (1990) em solos tratados com vinhaça, palha de soja e bagaço de cana e complementados com doses de sulfato de amônio e apatita-de-araxá, como fonte de fosfato. A complementação mineral com nitrogênio e fósforo favoreceu a atividade microbiana na decomposição dos resíduos orgânicos adicionados ao solo. Catellan & Vidor (1990) constataram que o nitrogênio foi um fator limitante para o desenvolvimento da comunidade bacteriana em um solo não adubado com nitrogênio e cultivado com gramíneas.

Fertilizantes fosfatados solúveis poderão, dependendo da dose, inibir a colonização radicular e a produção de micélio ativo e externo total dos fungos micorrízicos arbusculares (Melloni, et al. 2000; Nogueira & Cardoso, 2001). Esses resultados sugerem certo cuidado no emprego de fungos micorrízicos como indicadores da qualidade do solo, pois o estabelecimento da simbiose micorrízica é um processo dinâmico, em que as mais variadas condições do hospedeiro influenciam o simbiote, e vice-versa, tanto no que se refere à disponibilidade de fósforo quanto à adaptação do fungo às condições do meio (Nogueira & Cardoso, 2001)

Os fertilizantes, além de atuarem diretamente sobre a planta, podem interferir na incidência de doenças, por causa de seus efeitos indiretos sobre o solo e sua microbiota, alterando a relação patógeno – microrganismos antagonistas na rizosfera.

Plantas não adubadas ou que receberam apenas N ou NPK mostraram redução acentuada na comunidade de fungos, bactérias e actinomicetos antagonistas ao *Fusarium oxysporum* na rizosfera e maior severidade da doença. Em adição a esse efeito indireto, a aplicação de fertilizantes pode reduzir a virulência do patógeno, interferindo na sobrevivência, viabilidade e germinação dos propágulos no solo, penetração e infecção das raízes e supressão de enzimas específicas do processo de patogenicidade, como as pectinases (Siqueira, 1988; Mafra & Miklós, 1998b). Na literatura, encontram-se trabalhos que abordam os possíveis efeitos prejudiciais dos fertilizantes minerais solúveis ao ambiente (Mafra & Miklós, 1998b).

### 4.3. Lodo de Esgoto

O lodo de esgoto é o resíduo que se obtém após o tratamento de águas servidas (esgotos), com a finalidade de torná-la menos poluída, de modo a permitir seu retorno ao ambiente sem que seja agente de poluição (Melo & Marques, 2000).

O lodo de esgoto, além de conter alto teor de matéria orgânica ( $40-75 \text{ g dm}^{-3}$ ), que pode melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, possui quantidades apreciáveis de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, podendo ser usado como fonte desses elementos para o crescimento das plantas (Melo et al., 2001). Entretanto, juntamente com o material orgânico e com os nutrientes disponíveis às plantas, o emprego de determinados lodos pode ser limitado pela presença de metais pesados, como Cu, Ni, Fe, Zn, Mn, Co, Hg, Cd, Pb e Cr, os quais, em quantidades consideráveis, podem levar à contaminação do solo e das plantas (Giller et al., 1998; Melo et al., 2001). Os metais pesados podem influenciar o crescimento, a morfologia e o metabolismo dos microrganismos do solo, reduzindo a atividade microbiana e a fertilidade do solo (Kelly & Tate 1998; Sandaa & Enger, 2001; Obbard, 2001; Moreno et al., 2001).

Nos estudos realizados para avaliar o impacto da aplicação de lodo de esgoto na microbiota do solo, verifica-se que a atividade microbiana, de uma maneira geral, não é influenciada quando o lodo contendo metais pesados é adicionado ao solo. Jahnel (1997) verificou que a adição de lodo de curtume, contendo  $1.142,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr, ao invés de diminuir, estimulou a liberação de  $\text{CO}_2$  no solo. Segundo o autor, isso ocorreu, provavelmente, devido à presença de matéria orgânica prontamente decomponível e ao alto teor de nutrientes existentes no lodo. Fortes Neto (2000) e Fernandes & Bettiol (2003) observaram acréscimo na liberação de  $\text{CO}_2$  com o aumento da dose de lodo de esgoto, não ocorrendo, em nenhuma das doses, inibição do processo respiratório, mesmo na dose mais elevada que correspondeu a  $32 \text{ Mg ha}^{-1}$  de lodo da ETE-Barueri.

De acordo com Lo et al. (1992), a matéria orgânica do lodo e do solo atuam na complexação de metais, reduzindo a sua disponibilidade a curto prazo e, conseqüentemente, a sua toxicidade, fornecendo, ao mesmo tempo, carbono para os microrganismos do solo. Entretanto, a ausência de efeitos prejudiciais da aplicação de lodo contendo metais pesados a curto prazo não é garantia de que, posteriormente, tais efeitos sobre a atividade e comunidade microbianas venham a ocorrer (Witter et al., 1994).



A liberação de CO<sub>2</sub> é influenciada pela concentração e tipo de metal pesado somente quando é adicionado ao solo na forma inorgânica. Hattori (1989, 1992) verificou uma redução acentuada na taxa de liberação de CO<sub>2</sub>, quando foram aplicadas no solo quantidades de metais pesados semelhantes àsquelas encontradas no lodo, porém sob a forma de sais minerais. Essa tendência de redução na respiração microbiana, de acordo com Leita et al. (1995), ocorre porque os metais pesados livres são rapidamente dissolvidos na solução do solo e ficam disponíveis para serem absorvidos pelos microrganismos, causando modificações na morfologia, inibição no crescimento e alterações no metabolismo, por meio de distúrbios funcionais, desnaturação de proteínas e destruição da integridade da membrana celular.

Os efeitos da aplicação de lodo na biomassa microbiana do solo estão relacionados à concentração, ao tipo e à forma de metais pesados liberados pela decomposição do lodo no solo. Brookes e Mc Grath (1984) e Dodson et al. (1997) verificaram que a adição de lodo contaminado com metais pesados proporcionou uma redução na biomassa microbiana do solo. No entanto, Jahnel (1997), Fortes Neto (2000) e Fernandes e Bettiol (2003) verificaram que a biomassa microbiana do solo não diminuiu com a aplicação de lodo de esgoto.

Quanto ao tempo para avaliar a ação dos metais pesados liberados pela mineralização do lodo sobre a biomassa microbiana, Fliebbach et al. (1994) e Chander et al. (1995) observaram que a adição de lodo contendo metais pesados causou aumento na biomassa microbiana durante quatro semanas, diminuindo após 64 semanas de incubação. Entretanto, no solo que recebeu o lodo com baixos teores de metais pesados, a biomassa microbiana aumentou. Provavelmente, a redução na biomassa microbiana do solo pelo lodo com concentrações mais elevadas de metais pesados ocorreu porque os complexos orgânicos contendo os metais foram desestabilizados, quando o carbono dos agentes ligantes foi consumido pelos microrganismos e os metais foram liberados para a solução e imobilizados pela microbiota do solo.

A aplicação de lodo de esgoto pode alterar vários processos bioquímicos do solo e a determinação de enzimas específicas do ciclo do C e N pode ajudar na compreensão da dinâmica da matéria orgânica do solo.

De acordo com Giller et al. (1998), Kunito et al. (2001) e Moreno et al. (2001), a atividade enzimática do solo foi inibida com o aumento da concentração de metais pesados presentes no solo, que foram adicionados como lodo de esgoto ou pela adição de sais. Entretanto, já se verificou que a atividade enzimática do solo pode não ser inibida com a aplicação de lodo de esgoto, tanto com baixa quanto alta concentração de metais pesados (Brendecke et al., 1993; Banerjee et al., 1997; Traser-Cepeda et al., 2000; Albiach et al., 2000; Rost et al., 2001 e Fernandes e Bettiol, 2003).

Quanto à mineralização do nitrogênio, vários trabalhos relatam a inibição dos processos de amonificação e nitrificação pelos metais pesados liberados pelo lodo. Chander et al. (1995), utilizando lodo com concentração de zinco, cobre e cádmio duas vezes superior ao limite estabelecido pela legislação americana, constataram que a presença desses metais pesados inibiu a ação dos microrganismos

na mineralização do nitrogênio no solo. Em um trabalho similar, com esterco, composto urbano e lodo enriquecido com zinco, cobre e cádmio, Hassen et al. (1998) verificaram que elevadas concentrações desses metais inibiram a amonificação e nitrificação e que baixas concentrações favoreceram a imobilização do nitrogênio.

Há consenso geral de que os efeitos dos metais pesados na mineralização de nitrogênio são difíceis de serem avaliados. As dificuldades são a falta de padronização dos procedimentos experimentais e variação nas propriedades do solo, que podem alterar a toxicidade absoluta ou relativa do metal e, também, porque existe um grande número de microrganismos capazes de mineralizar os compostos nitrogenados (Baath, 1989). Segundo Duxbury (1985), a informação sobre a ação dos agentes poluentes nesses processos é conflitante e recomenda-se cautela na avaliação. Isso porque o processo de adaptação aos metais pesados e a seleção de estirpes resistentes podem ocorrer em prazo tão curto quanto o período de exposição dos microrganismos do solo ao lodo (Rother et al., 1992).

## Referências

- ALBIACH, R.; CANET, R.; POMARES, F.; INGELMO, F. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. **Bioresource technology**, v.75, p.43-48, 2000.
- ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2.ed. New York: J. Willer, 1977. 467p.
- ANDRÉA, Curso regional de agricultura orgânica e adubação verde para agricultura orgânica. Piracicaba-SP, 2000.
- BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial process and population (a review). **Water Air Soil Pollution**, v.47, p.335-379, 1989
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, n.4, p.641-649, 1998.
- BANERJEE, M.R.; BURTON, D.L.; DEPOE, S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v.66, p.241-249, 1997.
- BARROS, E.S. Biodegradação e adsorção de hexaclorobenzeno em areia quartzosa. Rio Claro, 1998. 85p. (Mestrado - Unesp).
- BRENDECKE, J.W.; AXELSON, R.D.; PEPPER, I.L. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage on an arid soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.2, n.5, p.751-758, 1993.
- BRIGANTE, J. Atrazina: a avaliação de sua distribuição e efeito sobre a comunidade microbiana em solo tropical. São Carlos: ERN-UFSCar, 1995. 123p. (Dissertação, Mestrado).
- BROCKELMANN, A.M. Avaliação da biodegradação de hexaclorobenzeno para fins de biorremediação. São Carlos: ERN-UFSCar, 2001. 87p. (Tese, Doutorado).

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology Fertility Soil**, v.19, p.269-279, 1995.

BROOKES, P.C.; MCGRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **Journal of Soil Science**, v.35, p.341-346, 1984.

BURKE, I.C.; ELLIOT, E.T.; COLE, C.V. Influence of macroclimate, landscape position, and management on soil organic matter in agroecosystems. **Ecology Applied**, v.5, p.124-131, 1995.

CAMPBELL, C.A.; MOULIN, A.P.; BOWREN, K.E. Effect of crop rotations on microbial biomass, specific respiratory activity and mineralization of nitrogen in Black Chernozemic soil. **Canadian Journal Soil Science**, v.72, p.417-427, 1992.

CATELLAN, A.J.; VIDOR, C.R. Flutuação da biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.133-142, 1990.

CHANDER, K.; BROOKES, P.C. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. **Soil Biology Biochemistry**, v.25, p.1231-1239, 1993.

CHANDER, K.; BROOKES, P.C.; HARDING, S.A. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. **Soil Biology Biochemistry**, v.27, p.1409-1421, 1995.

COOK, K.A.; GREAVES, M.P. Natural variability in microbial activities. In: SOMMERVILLE, L.; GREAVES, M.P. (Ed) **Pesticide effects on soil microflora**. London, New York, Philadelphia: Taylor and Francis, 1987. pp 15-43.

COSTA, M.A. Biodegradação de 14 C-ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba: USP/CENA, 1992. 107p. (Dissertação, Mestrado).

DELLAMATRICE, M. Degradação do herbicida Diuron por *Acinetobacter baumannii* e pela microbiota do solo. Piracicaba, 2000, 53p. (Doutorado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP).

DICK, R.P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicsek, D.F.; Stewart, B.A. (Eds.), **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, Soil Sci. Soc. Am. Special Publication n.35. Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 107-124, 1994.

DODSON, M.S.; CINTRA, A.A.D; SILVA, T.E. Biomassa microbiana em latossolo roxo tratado com lodo de esgoto contaminado com doses crescentes de crômio e cultivado com sorgo granífero. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro. 1997. **Anais**. Rio de Janeiro, 1997. p.480.

DORAN, J.W; PARKINSON, T.B. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicsek, D.F.; Stewart, B.A. (Eds.), **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, Soil Sci. Soc. Am. Special Publication n. 35. **Soil Science Society of America**, Madison, WI, p. 3-22, 1994.

DUXBURY, T. Ecological aspects of heavy metal responses in micro-organisms. **Advances Microbil. Ecology**, v.8, p.185-235, 1985.

ELSAS, J.D.VAN; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. **Modern soil microbiology**. Marcel Dekker, New York. 1997. 682p.

- ESPOSITO, E.; PAULINO, S.M.; MANFIO, G.P. Biodegradation of herbicide diuron in soil by indigenous actinomycets. **Chemosphere**, v.37, p.541-548, 1998.
- FEIGL, B.J. Changes in the origin and quality of soil organic matter after pasture introduction in Rondônia (Brazil). **Plant and Soil**, v.175, p.21-29, 1995.
- FERNANDES, S.A.P.; BETTIOL, W. Efeito do lodo de esgoto na microbiota do solo. Documento da Embrapa - CNPMA, Jaguariúna, SP. 2003.
- FERNANDES, S.A.P. Propriedades do solo na conversão de floresta em pastagem fertilizada e não fertilizada com fósforo na Amazônia (Rondônia). Piracicaba, 1999, 131p. (Doutorado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP).
- FLIESSBACH, A.; MARTENS, R.; REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soil treated with heavy metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology Biochemistry**, v.26, p.1201-1205, 1994.
- FORTES NETO, P. Degradação de biossólido incorporado ao solo avaliada através de medidas microbiológicas. Piracicaba. 2000. 113p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. (Tese, Doutorado).
- GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, p.1389-1414, 1998.
- GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; ANGERS, D.A.; MONREAL, C.M.; ELLERT, B.H. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal Soil Sci.**, v.74, p.367-385, 1994.
- HASSEN, A.; JEDIDI, N.; CHIERIF, M.; HIRI, A. Mineralization of nitrogen in a clayey loamy soil amended with organic wastes enriched with Zn, Cu and Cd. **Bioresource Technology**, v.64, p.39-45, 1998.
- HATORI, H. Influence of cadmium on decomposition of sewage sludge and microbial activities in soils. **Plant Nutrition**, v.35, p.289-299, 1989.
- HATORI, H. Influence of heavy metals on soil activities. **Plant Nutrition**, v.38, p.93-100, 1992.
- HOLE, S.J.; McCLURE, N.C.; POWLES, S.B. Rapid degradation of carbetamide upon repeated application to Australian soils. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.739-745, 2001.
- JAHNEL, M.C. Método de plaqueamento por gotas e outros parâmetros microbiológicos na avaliação da degradação de lodo ativado de curtume em solos. Piracicaba. 1997. 79p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. (Tese, Doutorado).
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology Biochemistry**, v.8, p.209-213, 1976.
- KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.J.; HARRIS, R.F.; SCUMAN, G.E. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.61, p. 4-10, 1997.
- KELLY, J.J.; TATE, R.L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. **Journal of Environmental Quality**, v.27, p.600-617, 1998.

KUNITO, T.; SAEKI, K.; GOTO, S.; HAYASHI, H.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. **Bioresource Technology**, v.79, p.135-146, 2001.

LANGEBARCH, T.; SCHROLL, R.; PAIM, S. Fate and distribution of <sup>14</sup>C-antrazine in a tropical oxisol. **Chemosphere**, v.40, p.449-455, 2000.

LEITA, L.; DENOBILI, M.; MONDINI, C.; MUHLBACHOURA, G.; MARCHINOL, L.; BRAGATO, G.; CONTIN, M. Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability. **Biology Fertility Soil**, v.28, p.371-376, 1995.

LO, K.L.S.; YANG, W.F.; LIN, Y.C. Effects of organic matter on the specific adsorption of heavy metals by soils. **Toxicology Environmental Chemistry**, 1992.

MACNAUGHTON, S.; STEPHEN, J.R.; CHANG, Y.J.; PEACOCK, A.; FLEMMING, C. A.; LEUNG, K.T.; WHITE, D.C. Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.116-124, 1999.

MAFRA, A.L.; MIKLÓS, A.W. Pesticidas agrícolas e suas inconveniências ambientais: colêanea bibliográfica. In: 3<sup>o</sup> Conferência Brasileira de Agricultura Biodinâmica. A Agroecologia em perspectiva. **Anais**. Piracicaba, SP, 231-274, 1998a.

MAFRA, A.L.; MIKLÓS, A.W. Fertilizantes minerais solúveis e suas inconveniências ambientais: colêanea bibliográfica. In: 3<sup>o</sup> Conferência Brasileira de Agricultura Biodinâmica. A Agroecologia em perspectiva. **Anais**. Piracicaba, SP, 203-230, 1998b.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W.J. Carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática de um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.257-263, 1999.

MELO, W.J.; MARQUES, O.M. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W; CAMARGO, O.A. (Eds). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000, p.193-142.

MELO, W.J. DE; MARQUES, O.M.; MELO V.P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALEM SOBRINHO, P; HESPANHOL I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. (Eds). **Biossólido na Agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. Cap. 11, p.289-363.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de herbicidas. In: Workshop sobre biodegradação, Campinas, 1996. **Anais**. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1996.p. 120-128.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIM, S.; SPESSOTO, A. II Workshop sobre Biodegradação, Campinas, SP, Brasil, 18-20 de junho de 2001.

MONTEIRO, R.T.R.; DELGADO, D.; QUEIROZ, B.P.V. Degradação de <sup>14</sup>C-antrazina nos horizontes A, AB e B de um solo Podzólico vermelho-amarelo abrupto. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 25., Viçosa, 1995. **Resumo Expandidos**. Viçosa: SBSCS.

MONTEIRO, R.T.R.; QUEIROZ, B.P.V.; CELLA, A.C. Distribution of <sup>14</sup>C-antrazine residues in humus fractions of Brazilian soil. **Chemosphere**, v.39, p.293-301, 1999.

MONTEIRO, R.T.R.; SPESSOTO, A.M.; LEÃO, J.C. Enhanced biodegradation of herbicide propanil in Brazilian soils. In: Latin-American Biodegradation and Biodeterioration Symposium, 2., Porto Alegre, 1996. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 1996. p.15-18.

MORENO, J.L.; GARCIA, C.; LANDI, L.; FALCHINI, L.; PIETRAMELLARA, G.; NANNIPIERI, P. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.483-489, 2001.

OBBARD, J.P. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amending soils. **Applied Geochemistry**, v.16, p.1405-1411, 2001.

OCIO, J.A.; BROOKES, P. C. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p. 685-694, 1990.

OSTIZ, S.B. Efeito de permetrina, glifosato e mancozeb na atividade respiratória e amilolítica de dois solos do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1991, 75p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. (Tese, Doutorado).

PEIXOTO, M.F.S.P.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e formação de resíduos ligados de <sup>14</sup>C-atrazina em Latossolo Vermelho Escuro e Gley Húmico. **Scientia Agricola**, v.15, p.147-151, 2000.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTESEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology Biochemistry**, v.19, p. 159-164, 1987.

ROQUE, M.R.A. Isolamento, caracterização e ecologia de *Acinetobacter baumannii* degradadora do herbicida diuron. Rio Claro: IB/UNESP, 2000. 119p. (Tese, Doutorado).

ROST, U.; JOERGENSEN, R.G.; CHANDER, K. Effects of Zn enriched sewage sludge on microbial activities and biomass in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.633-638, 2001.

ROTHER, J.A.; MILLBANK, J.W.; THORNTON, I. Effects of heavy-metal additions on ammonification and nitrification in soils contaminated with cadmium, lead and zinc. **Plant and Soil**, v.69, p.239-258, 1992.

SANDAA, R.A.; ENGER, O. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.33, p.287-295, 2001.

SANTOS, T.M.; MONTEIRO, R.T.R. Número de microrganismos e atividade de urease na presença de aldicarbe e endosulfan no solo. **Scientia Agricola**, v.15, p. 123-130, 1994.

SANYAL, D.; KULSHRETHA, G. Effects of repeated metolachlor applications on its persistence in field soil and degradation kinetics in mixed microbial cultures. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p. 124-131, 1999.

SILVA, C.M.M.S. Biodegradação do fungicida carbendazim. Rio Claro: UNESP, 1996. 86p. (Tese, Doutorado).

SIQUEIRA, J.O. **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE. 1988. 236p.

SPESSOTO, A.M. Biodegradação do herbicida <sup>14</sup>C-propanil em solos secos e alagados. Piracicaba: CENA/USP, 1996. 103p. (Dissertação, Mestrado).

TORSVISK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R. A.; OVEREAS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Bacteriology**, v.64, p. 53-62, 1998.

TRASER-CEPEDA, C.; LEIROS, M.C.; SEONE, S.; GIL-SOTRES, F. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. **Soil Biology Biochemistry**, v.32, p.1867-1875, 2000.

TURCO, F.R.; KENNEDY, A.C.; JAWSON, M.D. Microbial indicators of soil quality. In: Doran, J.W.I Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. (Eds.), Defining Soil Quality for a Sustainable Environment, Soil Sci. Soc. Am. Special Publication n. 35. **Soil Science Society of America**, Madison, WI, p. 73-90, 1994.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Comparison of physiological techniques for estimating the response of the soil microbial biomass to soil moisture. **Soil Biology Biochemistry**, v.22, p. 817-823, 1990.

WITTER, E.; GILLER, K.E.; MCGRATH, S.P. Long-term effects of metal contamination soil microorganisms. **Soil Biology Biochemistry**, v.26, p.421-422, 1994.

# Capítulo 15

## Uso de Resíduos na Agricultura e Qualidade Ambiental

Wanderley José de MELO <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

O crescimento populacional gera a necessidade de aumento na produção de alimentos, que pode ser obtido pela incorporação de novas áreas ao sistema produtivo ou pela adoção de técnicas que aumentem a produtividade. Para aumentar a produtividade os agricultores fazem uso de insumos (calcário, fertilizantes minerais, inseticidas, fungicidas, herbicidas, antibióticos, reguladores de crescimento e, mais recentemente, sementes transgênicas) que, à medida que resolvem alguns dos problemas, criam outros, como o desequilíbrio biológico, a poluição ambiental, o acúmulo de resíduos urbanos e industriais. Dessa forma, no momento atual da história, a equação a ser resolvida é a recuperação das áreas degradadas, o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis e um destino ambiental e economicamente correto para os inúmeros resíduos gerados pelas diferentes atividades antrópicas.

A concentração desordenada do homem em grandes centros urbanos e a exigência cada vez maior de bens de consumo levam à produção de grandes quantidades de resíduos como o lodo das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), o lodo das Estações de Tratamento de Água (ETAs), o lixo doméstico, o lixo da construção civil, o lixo hospitalar, dentre outros, que se concentram em pequenas áreas e devem ser dispostos de maneira racional, sem causar riscos à saúde do homem e dos animais, à degradação do meio ambiente e ao sistema de produção agrícola e pecuária.

Pelos volumes gerados e pela importância atual, dar-se-á, neste capítulo, ênfase para o lodo gerado nas ETEs (lodo de esgoto ou biossólido) e o lodo gerado nas ETAs.

---

<sup>(1)</sup> Professor - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, CEP 14.884-900, Jaboticabal, SP. E-mail: wjmelo@fcav.unesp.br.

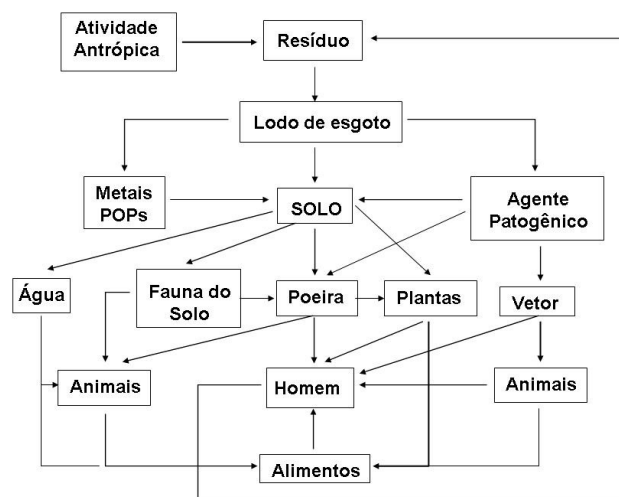


## 2. Composição e Impactos Causados pelos Resíduos

A composição dos resíduos atualmente produzidos e acumulados, principalmente nos grandes centros urbanos, é extremamente variável (Tabelas 1 e 2), resultando em diferentes impactos sobre o meio ambiente, o que dificulta a definição de uma destinação ambiental e economicamente correta para os mesmos. Resíduos com elevado conteúdo de matéria orgânica e nutrientes de plantas, pobres em componentes tóxicos e em agentes transmissores ou causadores de doenças podem ser utilizados em áreas agrícolas, substituindo parcial ou totalmente os fertilizantes minerais. Resíduos ricos em componentes tóxicos ou com potencial para causar doenças aos homens, aos animais, aos vegetais e aos organismos do solo devem ter uma outra destinação, adequadamente construída e monitorada.

A composição química do lodo de esgoto é muito variável em função da origem dos processos utilizados no tratamento, incluindo os métodos de higienização e estabilização adotados (Tabela 1). De modo geral, trata-se de um resíduo rico em matéria orgânica, N, P, Ca e micronutrientes como Cu, Zn, Mn e Fe, com uma composição muito próxima à do esterco de galinha, resíduo orgânico largamente utilizado na agricultura, inclusive na chamada agricultura orgânica (Tabelas 2 e 3). É pobre em K, de tal forma que seu uso na agricultura requer uma complementação com esse macronutriente.

Contudo, ao lado dos componentes benéficos ao solo e à nutrição das plantas, o lodo de esgoto encerra em sua composição elementos, substâncias ou organismos potencialmente prejudiciais à saúde do homem. Tais componentes (Tabelas 4 a 6), de modo direto ou indireto, podem entrar na cadeia alimentar, fato indesejável e que deve ser evitado a todo o custo. A Figura 1 mostra as principais rotas de entrada na cadeia alimentar de metais pesados, POPs (produtos orgânicos persistentes) e agentes patogênicos presentes no lodo de esgoto, quando aplicado ao solo.



**Figura 1.** Rotas de contaminação do homem por metais pesados, POPs e agentes patogênicos presentes no lodo de esgoto aplicado no solo.

O lodo de esgoto ainda pode encerrar em sua composição as chamadas substâncias tóxicas persistentes (Aldrin, Clordane, Dieldrin, Endrin, Heptaclor, Heptaclorbenzeno, Mirex, Toxafeno, Bifenilas Poliacrlradas - PCBs, DDT, BHC, Hexaclorobenzeno, Dioxinas). O Brasil, pelo decreto 5.472, de 22 de junho de 2005, adotou os termos da Convenção de Estocolmo, que regulamenta o uso dos chamados produtos orgânicos persistentes (POPs).

O lodo de esgoto gerado nos centros urbanos mais industrializados apresenta um potencial de risco mais elevado, que se deve principalmente à presença de elementos e substâncias tóxicas (Tabela 1), ao passo que nos gerados nos centros urbanos menos industrializados o maior potencial de risco está na presença de agentes causadores de doenças, como os ovos de helmintos. É o caso, por exemplo, do lodo de esgoto gerado na ETE de Franca, SP, que apresenta número de ovos viáveis de helmintos mais elevado do que o permitido pela legislação ambiental vigente no Estado, para uso na agricultura (Comparini & Sobrinho, 2002).

**Tabela 1.** Composição química do lodo de esgoto em função da origem do esgoto e do processo utilizado no tratamento <sup>(1)</sup>.

Elemento	SABESP (SP)		SANEPAR (PR)	
	ETE Barueri	ETE Franca	ETE Belém	Ralf
	g kg <sup>-1</sup>			
N	22,5	79,1	49,1	22,1
P	3,2	10,6	3,7	2,1
K	0,04	0,63	1,5	1,4
Ca	72,9	22,1	15,9	8,3
Mg	9,6	2,1	6,0	3,0
S	5,1	nd	nd	nd
	mg kg <sup>-1</sup>			
Cu	703	98	439	89
Fe	nd	42.224	nd	nd
Mn	nd	1.868	nd	nd
Zn	1.345	1.868	824	456
B	nd	nd	118	nd
Mo	23	1	nd	nd

<sup>(1)</sup> Adaptado de Melo et al. (2002a). Ralf= reator anaeróbio de lodo fluidizado. nd= não disponível.

Dependendo da origem do esgoto e do tipo de tratamento realizado na ETE, o resíduo pode conter microrganismos patogênicos ao homem e aos animais, os quais apresentam um tempo de vida variável no solo (Tabela 5) e na superfície dos vegetais (Tabela 6), que depende do tipo de microrganismo, das condições climáticas, do tipo de solo e da espécie vegetal.

**Tabela 2.** Macronutrientes em lodo de esgoto e alguns resíduos orgânicos tradicionalmente utilizados na agricultura. <sup>(1)</sup>

Resíduo	C	N	P	K	Ca	Mg	S
	g kg <sup>-1</sup> (base seca)						
Esterco bovino	486	27	18	32	30	9	3
Esterco de galinha	311	31	18	16	51	11	4
Esterco de porco	273	32	9	23	55	14	nd
Composto de lixo	278	10	3	5	19	2	3
Lodo de esgoto	340	32	16	4	32	12	4
Vinhaça	200	12	2	60	20	8	10
Torta de filtro	347	13	9	3	22	4	13
Torta de mamona	495	50	8	12	20	6	nd
Mucuna	461	23	5	23	15	3	nd
<i>Crotalaria juncea</i>	500	20	3	21	14	3	nd

<sup>(1)</sup> nd= não disponível. Fonte: Raij et al. (1997).

**Tabela 3.** Micronutrientes em lodo de esgoto e alguns resíduos orgânicos tradicionalmente utilizados na agricultura. <sup>(1)</sup>

Resíduo	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
	mg kg <sup>-1</sup> (base seca)					
Esterco bovino	nd	160	7336	552	16	128
Cama poedeira	nd	nd	nd	240	nd	210
Composto lixo	1,0	229	23325	304	22	340
Torta mamona	nd	33	2876	77	nd	156
Cama frango	nd	nd	nd	360	nd	280
Biossólido	118	98,0	42224	242	9,2	1868

<sup>(1)</sup> nd= não disponível. Fonte: Melo et al. (2002a).

**Tabela 4.** Metais pesados em biossólido e outros resíduos orgânicos de uso tradicional na agricultura <sup>(1)</sup>.

Resíduo	Cu	Mn	Zn	Pb	Cd	Ni	Cr	Hg
	mg kg <sup>-1</sup>							
Esterco bovino	38	nd	330	1,52	0	3,0	nd	nd
Esterco galinha	31	nd	306	38	4,4	4,4	nd	nd
Esterco porco	1100	nd	1009	13	nd	8,3	nd	nd
Composto lixo	13-3580	60-3900	82-5894	1,3-2240	0,01-100	0,9-279	1,8-410	0,09-2,1
Biossólido	50-8000	60-3900	90-49000	2-7000	0-3410	6-5300	8-40600	1-260
Aguapé	33	nd	50	33	nd	17	nd	nd

<sup>(1)</sup> Fontes: Raij et al. (1997), Ross (1994). nd= não determinado.

De forma direta, os metais e organismos adicionados ao solo pelo lodo de esgoto e outros resíduos podem ser ingeridos, principalmente por crianças, ou aspirados na forma de poeira. De forma indireta, podem chegar ao homem pelos alimentos de origem vegetal ou animal, que foram contaminados pela presença dos elementos, substâncias ou organismos perniciosos presentes no lodo de esgoto.

**Tabela 5.** Tempo de sobrevivência de agentes patogênicos no solo.

Organismo	Tempo (dias)
Coliformes	4-77
Coliformes fecais	4-55
<i>Streptococos fecais</i>	8-770
<i>Leptospira</i>	<15
<i>Mycobacterium</i>	10-450
<i>Salmonella paratyphi</i>	>259
<i>Salmonella typhi</i>	11->280
Vírus	90
Protozoários e cistos	2
Helmintos e ovos	720

Fonte: EPA (1985).

**Tabela 6.** Sobrevivência de agentes patogênicos em vegetais.

Bactéria	Espécie	Tempo (dias)
Coliformes	Tomate	>30
	Folhas de vegetais	35
<i>Escherichia coli</i>	Vegetais	<21
<i>Mycobacterium</i>	Alface	>35
	Rabanete	>13
<i>Salmonella typhi</i>	Rabanete	24-53
	Alface	18-21
<i>Salmonella spp</i>	Folhas de vegetais	7-40
	Folha de beterraba	21
	Tomate	3-7
	Couve	5
<i>Shigella spp</i>	Tomate	2-5
	Folhas de vegetais	2-7
<i>Vibrio cholerae</i>	Vegetais	5-7

Fonte: EPA (1985).

A composição do lodo de ETA também é muito variável, dependendo da origem da água a ser tratada e do processo de tratamento utilizado, podendo conter até 99% de umidade. Contém quantidades variadas de óxidos de cálcio e de magnésio, o que lhe confere um poder de neutralização (Tabela 7), e de outros óxidos (óxidos de ferro, de alumínio e de silício).

**Tabela 7.** Poder de neutralização do lodo de ETA gerado no DAAE de Araraquara-SP.<sup>(1)</sup>

Atributo	%
CaO	9,8
MgO	4,23
PN	28,04

<sup>(1)</sup> PN= potencial de neutralização. Fonte: informação pessoal da equipe técnica que opera a ETA.

Em resumo, o impacto positivo do lodo de esgoto e do lodo de ETA, quando aplicados ao solo, está em melhorar atributos físicos, químicos e biológicos, com potencial para fornecer nutrientes para as plantas. Dessa forma, contribuem para diminuir as doses dos fertilizantes minerais, com diminuição nos custos da adubação e nos impactos causados pelo seu uso, que também encerram em seu bojo uma série de componentes tóxicos.

O impacto negativo, por outro lado, reside na presença dos metais pesados, de substâncias tóxicas persistentes, da atração a transmissores de doenças e da presença de organismos patogênicos. Mesmo com relação aos nutrientes das plantas, se houver desequilíbrio entre os elementos presentes poderá ocorrer impacto negativo sobre o desenvolvimento das plantas. É o caso do elevado teor de Ca, quando o lodo de esgoto é tratado com cal, de Fe, Ca e Al, no lodo de ETA, em função do tipo de tratamento utilizado, em que o impacto no solo pode ser negativo, devido à grande elevação no pH e ao desequilíbrio na relação Ca/Mg e de outros nutrientes.

### 3. Uso de Resíduos na Agricultura

A possibilidade de uso de resíduos em áreas agrícolas, a quantidade de resíduo e o número de vezes em que a aplicação pode ser repetida vai depender de uma série de fatores: composição do resíduo, clima da região, tipo de cultura, tipo de solo, declividade do terreno, localização da área, principalmente com relação à presença de cursos d'água e movimento de pessoas e animais.

Os lodos de esgoto e de ETA que apresentem baixo conteúdo em metais pesados, em organismos patogênicos, em substâncias tóxicas persistentes, com bom equilíbrio entre os nutrientes das plantas e uma matéria orgânica de boa qualidade podem ser utilizados com baixos riscos em áreas agrícolas.

A aplicação do lodo de esgoto em áreas cultivadas tem melhorado as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, assim como causado diminuição nos custos de produção pela diminuição no uso de fertilizantes minerais, que também são agentes de poluição.

Os pesquisadores e os responsáveis pelos órgãos de fiscalização ambiental no Brasil têm procurado por índices que possam definir a qualidade dos solos e avaliar da forma mais incipiente possível os impactos negativos causados pela prática de aplicação de resíduos em áreas agrícolas, de modo a estabelecer uma legislação

que regulamente o assunto. Esse objetivo ainda não foi alcançado, de tal modo que ainda hoje predominam as legislações com base no conteúdo de agentes causadores de impactos negativos e doses acumuladas que se permitem atingir em dado espaço de tempo.

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos sobre as propriedades do solo, a produtividade das culturas e os riscos de poluição do solo e de transmissão de doenças. Contudo, a grande maioria dos trabalhos tem se limitado a estudos em vasos ou em condições de campo em experimentos com curta duração.

O lodo de ETA apresenta potencial poluidor, não devendo ser retornado aos mananciais hídricos, sob o risco de severos danos ao ambiente. Dentre as alternativas de disposição final para o lodo de ETA incluem-se: aplicação ao solo (agricultura, floresta, recuperação do solo), aterros sanitários, fabricação de cimento e tijolos, compostagem (em mistura com lodo de ETE) e produção de vasos.

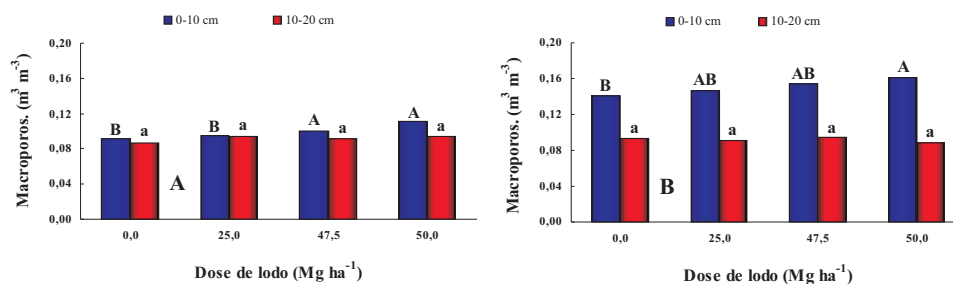
Para alguns pesquisadores, o lodo de ETA não incorpora interesse agrônômico, principalmente devido ao uso de coagulantes no processo de tratamento da água, mas pode ser utilizado como material inerte, quando a concentração do coagulante usado, principalmente o sulfato de alumínio, for baixa, ou se for misturado ao lodo de esgoto, quando a ETA e a ETE estiverem próximas (SANEPAR, 2001).

Todavia, a aplicação de lodo de ETA em solos agrícolas vem sendo praticada em alguns estados norte-americanos e tem provocado melhoria na estrutura do solo, elevação no pH, adição de nutrientes, aumento na umidade e na aeração, embora também tenham sido observados efeitos negativos como aumento no potencial de adsorção de fósforo e fitotoxicidade por alumínio. No Estado de Atlanta (USA), o lodo de ETA é removido diariamente e bombeado para tanques, onde permanece até atingir teor de umidade na faixa 10-15 %, sendo então aplicado ao solo na dose de 11-33 Mg ha<sup>-1</sup>. Dessa forma, são tratados cerca de 200 ha ano<sup>-1</sup> com lodo de ETA, fazendo-se um controle trimestral da qualidade do lodo, do solo e das plantas. No Estado de New Jersey (USA), onde se usa o alumínio como coagulante, o lodo de ETA é aplicado ao solo com cerca de 25-30% de umidade e na dose de 45 Mg ha<sup>-1</sup> (Teixeira, 2004).

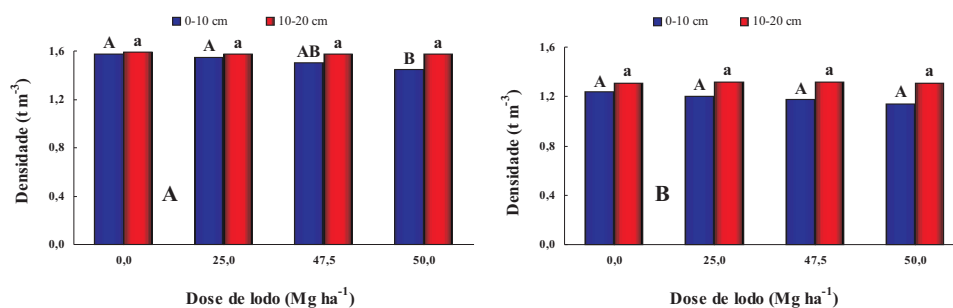
### 3.1. Efeitos Sobre as Propriedades Físicas e Químicas do Solo

De modo geral, a aplicação de lodo de esgoto ao solo tem colaborado para melhoria de suas propriedades físicas como densidade, capacidade de retenção de água e porosidade. Propriedades químicas, principalmente às ligadas à fertilidade do solo, também têm sido, via de regra, melhoradas pela adição de lodo de esgoto.

A aplicação de lodo de esgoto em solo agrícola tem causado diminuição na densidade do solo (Jorge et al., 1991; Marciano, 1999), aumento no número de macroagregados (Jorge et al., 1991), na porosidade total (Ortega et al., 1981; Marciano, 1999) e na capacidade de retenção de água (Jorge et al., 1991; Marciano, 1999). Melo et al. (2004) avaliaram o efeito da aplicação sucessiva de lodo de esgoto em Latossolo Vermelho eutrófico (LVef) e em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) sobre a densidade, porosidade e retenção de água, observando que somente ocorreram efeitos na camada 0-10 cm, na qual o lodo de esgoto foi incorporado.



**Figura 2.** Macroporosidade em LVd (A) e em LVef (B) tratado com lodo de esgoto por cinco anos consecutivos e cultivado com milho (Melo et al., 2004).



**Figura 3.** Densidade em LVd (A) e em LVef (B) tratado com lodo de esgoto por cinco anos consecutivos e cultivado com milho. (Fonte: Melo et al., 2004).

A macroporosidade foi superior a partir da dose acumulada de 47,5 Mg ha<sup>-1</sup> (base seca) no LVd e de 50 Mg ha<sup>-1</sup> no LVef (Figura 2). A densidade do solo foi menor na dose 50,0 Mg ha<sup>-1</sup> (Figura 3). A aplicação de 50,0 Mg ha<sup>-1</sup> não alterou a porosidade total, a microporosidade e a retenção de água nos dois solos.

Entre as alterações químicas mais comumente observadas estão aumento no teor de matéria orgânica (Marques, 1997; Melo et al., 2002b), na CTC (Melo et al., 1994; Melo et al., 2002a), no pH (Oliveira, 1995; Berton et al., 1997; Silva et al., 1999), nos conteúdos em fósforo (Ros et al., 1993; Marques, 1997; Silva et al., 1999; Melo et al., 2002b), cálcio, magnésio, enxofre (Marques, 1997, Silva et al., 1999) e nitrogênio (Cunningham et al., 1975; Cripps et al., 1992; Ros et al., 1993; Melo, 2006). Aumentos também têm sido observados para ferro, manganês, zinco e cobre (Melo et al., 2002a). Apesar do lodo de esgoto ser pobre em K, Marques (1997), em solo LE textura média cultivado com cana-de-açúcar, observou aumento no teor de K extraível após um ano de aplicação do resíduo. Os resultados de pesquisa também têm evidenciado diminuição na acidez potencial (Marques, 1997; Silva et al., 1998) e no conteúdo de alumínio trocável (Berton et al., 1989).

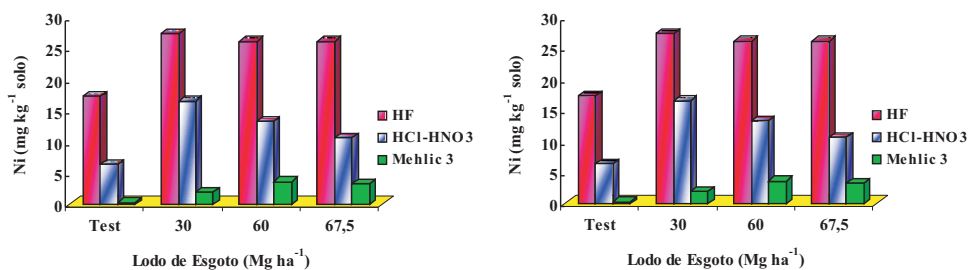
Ao lado dos benefícios esperados e observados, o lodo de esgoto pode causar danos ao solo e ao ambiente pelo conteúdo em metais pesados (Tabela 3), elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo (Tabela 1), presença de elementos e substâncias tóxicas, de agentes causadores ou vetores de doenças.

O comportamento dos metais pesados no solo depende da concentração, do metal e de atributos do solo como acidez, conteúdo e qualidade da matéria orgânica, conteúdo em óxidos de ferro, alumínio e manganês, conteúdo e tipo dos minerais de argila e potencial de redox. Em função do conjunto de atributos do solo, do metal pesado e de sua concentração, o metal pode se encontrar em forma biodisponível para as culturas e, dependendo da espécie vegetal, ser absorvido e translocado até os grãos, podendo adentrar a cadeia trófica dos animais e do homem. Em forma solúvel e em solos com baixa capacidade de adsorção, os metais pesados podem se deslocar para as camadas mais profundas e, dependendo da profundidade do solo, atingir o lençol freático, sendo a água o portador para a entrada na cadeia trófica. Dessa forma, é de fundamental importância, para uso de resíduos em área agrícola, conhecer sua composição em metais pesados e o seu comportamento no solo onde o resíduo será aplicado.

Melo (2002), em estudo de três anos com a cultura do milho cultivada em solos (LVd e LVef) que receberam doses crescentes de lodo de esgoto rico em metais pesados, verificou que o Ni se concentrou na camada superficial do solo, não se movimentando no perfil. No mesmo experimento, mas após seis anos de aplicação de lodo rico em Ni, observou-se que a maior parte do metal se encontrava presente na fração do solo altamente resistente à decomposição, somente sendo removido por ataques sucessivos com  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  e  $\text{HF}$  concentrados e a quente (Aguiar et al., 2004; Oliveira et al., 2005). A fração do metal ligada à matéria orgânica encontrava-se na fração humina, a forma mais estável da matéria orgânica do solo (Figura 4).

O nitrogênio e o fósforo, que se encontram no lodo de esgoto predominantemente em forma orgânica, ao serem mineralizados no solo, produzem fosfatos e nitratos, que podem alcançar o lençol freático e serem agentes de poluição.

A adição de óxidos e hidróxidos metálicos ao solo pode melhorar suas características físicas, melhorando a capacidade de retenção de água e a capacidade de troca catiônica, o que constitui o real benefício da utilização agrícola do lodo de ETA (Skene et al., 1995). Contudo, os óxidos e hidróxidos são fortes adsorventes de elementos traços, podendo diminuir sua disponibilidade. Segundo a AWWA (1990), o problema mais sério associado à aplicação de lodo de ETA em solo agrícola é a adsorção de fósforo, sendo que quanto maior o teor de goethita maior será a adsorção.



**Figura 4.** Formas de Ni em Latossolo Vermelho distrófico tratado com lodo de esgoto por seis anos consecutivos e cultivado com milho. (Fonte: Aguilar et al., 2004).



Um dos efeitos freqüentemente observados, quando se aplica lodo de ETA ao solo, é um aumento no pH. Bugbee & Frink (1985), utilizando lodo de ETA (coagulante alumínio), observaram aumentos de 0,5 a 1,0 unidade de pH na camada 0-10 cm em solos de floresta, quando o lodo apresentava 22% de poder neutralizante. Heil & Barbarick (1989) observaram aumento no pH de solos ácidos de 4,0 para 7,0, quando adicionaram lodo de ETA (coagulante cloreto férrico) nas doses de 0,5 e 2,5%. Ao se aplicar lodo de ETA (coagulante sulfato de alumínio) em solo degradado por mineração de cassiterita, Silva et al. (2005) constataram elevação no pH de 4,9 para 8,2, aos 30 dias após a aplicação, aumento nos teores de K (0,5 a 3,1 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>), Ca (5 a 46 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>), Mg (2 a 16 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>), CTC (19,5 a 70,1 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>) e de 63 para 93% na saturação por bases. Por outro lado, a acidez potencial caiu de 12 para 5 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> (Tabela 8). Também ocorreu aumento no teor de C-orgânico de 0,70 a 1,80 g kg<sup>-1</sup> e de N-total (0,04 a 0,22 g N kg<sup>-1</sup> solo), levando a relação C/N a decrescer de 25,27 para 8,62 (Tabela 9).

**Tabela 8.** Fertilidade de solo degradado pela mineração de cassiterita aos trinta dias após a adição de doses crescentes de lodo de ETA. (1)

Trat.	pH	P (res)	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	CaCl <sub>2</sub>	mg dm <sup>-3</sup>	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>						%
Ta*	4,9	3	0,5	5	2	12	7,5	19,5	63
D1	8,1	4	2,1	40	14	5	56,2	61,2	92
D2	8,2	4	2,5	40	12	5	54,5	59,5	92
D3	8,2	4	3,1	46	16	5	65,1	70,1	93

(1) Ta = testemunha absoluta; D1, D2 e D3 = 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> solo de N-LETA, respectivamente (base seca). Fonte: (Silva et al., 2005).

**Tabela 9.** C-orgânico, N-total e relação C/N em solo degradado pela mineração de cassiterita, aos trinta dias após a adição de lodo de ETA. (1)

Trat.	C	N	C/N
	g kg <sup>-1</sup> solo		
Ta	0,70 d	0,05b	17,33 a
Tq	0,53 d	0,03 bc	25,27 a
D1	1,37 c	0,01b	14,78 ac
D2	1,62 b	0,16 a	10,32 ad
D3	1,80 a	0,22 d	8,62 b

(1). Ta = testemunha absoluta, Tq = testemunha química, D1, D2 e D3 = 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> solo de N-LETA, respectivamente. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. (Fonte: Silva et al., 2005).

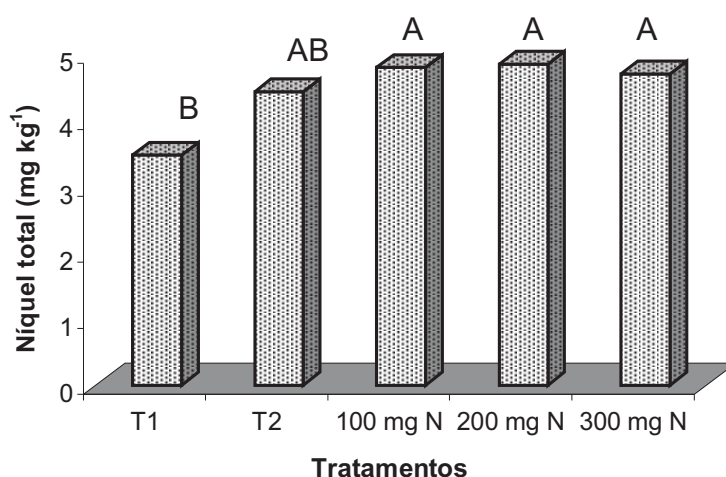
O teor total de fósforo do solo pode aumentar pela adição de lodo de ETA. Contudo, em função da elevação do pH do solo ou do conteúdo em alumínio, caso de solos ácidos, o teor de fósforo disponível pode tornar-se tão baixo a ponto de as plantas evidenciarem sintomas de deficiência do elemento.

Em função do tratamento com cal, o lodo de ETA tende a elevar o teor de Ca do solo, fato que pode causar danos ao desenvolvimento das plantas, uma vez que o cálcio em excesso concorre com a absorção de outros cátions, principalmente K e Mg. No caso específico dos dados contidos na tabela 8, a relação Ca/Mg foi da ordem de 3:1 que, segundo Raij et al. (1997), está na faixa adequada para o bom crescimento das plantas. O lodo de ETA pode causar também aumento nos teores de alguns micronutrientes, caso do Cu, Fe e Mn (Tabela 10) e de metais pesados, como pode ser observado para o Ni (Figura 5).

**Tabela 10.** Teores totais de micronutrientes em solo degradado pela mineração de cassiterita, aos 25 dias após a adição de LETA. (1)

Tratamentos	Teores totais (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Mn	Fe	Cu	Zn
Ta	187 c	228 c	37 bc	87 a
Tq	169 c	273 c	33 c	66 b
D1	411 b	77188 b	46 b	74 ab
D2	526 a	81192 b	51 a	77 ab
D3	601 a	97497 a	55 a	89 a

(1) Ta= testemunha absoluta, Tq= testemunha química. D1, D2 e D3= 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> solo de N-LETA, respectivamente. Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. (Fonte: Silva, 2004).



**Figura 5.** Ni em solo degradado pela mineração de cassiterita e tratado com lodo de ETA. T1 = testemunha absoluta, T2 = testemunha química. Valores seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. (Fonte: Silva, 2004).

### 3.2. Efeitos Sobre as Propriedades Biológicas e Bioquímicas do Solo

Os resíduos podem alterar a diversidade e a atividade dos organismos do solo em função de sua composição, das doses aplicadas e das condições do ambiente. A biomassa microbiana (BMS), a atividade respiratória e a atividade enzimática são os primeiros atributos influenciados pela ação dos poluentes presentes nos resíduos, de modo que podem ser fatores importantes na definição da qualidade do solo e na orientação do tipo de resíduo que se poderá aplicar ao solo e suas respectivas doses e tempos de aplicação. Como resposta à presença de metais pesados poderá ocorrer redução na diversidade e atividade da microbiota, na formação e atividade de simbioses radiculares, na velocidade de decomposição do material orgânico que chega ao solo, com reflexos na ciclagem dos nutrientes, na degradação de substâncias tóxicas e na imobilização de metais pesados.

Os microrganismos são mais sensíveis aos metais que os demais organismos do solo e que as plantas, de tal modo que a avaliação da biomassa microbiana do solo (BMS) constitui-se em atributo que pode ser útil na avaliação dos efeitos negativos dos resíduos aplicados ao solo. Todavia, o efeito da aplicação de resíduos sobre a BMS depende do tipo de resíduo, de sua constituição, do tipo de solo, da profundidade de amostragem, do lapso de tempo entre a aplicação do resíduo e a amostragem e da comunidade avaliada. Alguns microrganismos necessitam de maior tempo de exposição para que ocorra redução na biomassa (Giller et al., 1998), de tal forma que é importante considerar, também, se a avaliação é feita em relação à biomassa total do solo ou a uma comunidade específica.

Segundo Angers et al. (1993) e Horwath & Paul (1994), a microbiota do solo pode ser usada como indicador biológico da qualidade do solo, uma vez que responde à toxicidade causada por poluentes.

Em função do tipo e da composição do resíduo e dos demais fatores que influenciam seu comportamento no solo, a BMS pode não ser alterada pela aplicação, pode ser diminuída ou até mesmo aumentada, como consequência dos efeitos benéficos da MO e seus efeitos nos atributos do solo e nos nutrientes presentes. Em determinadas doses, mesmo contendo metais pesados, o lodo de esgoto pode causar aumento na atividade biológica do solo, uma vez que os metais pesados podem ser complexados pelo componente coloidal, tornando-se indisponíveis para absorção pelos microrganismos (Sastre et al., 1996).

Muitos trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a biodiversidade dos solos correlaciona-se com sua qualidade e sustentabilidade, de tal modo que é muito importante sua avaliação como resposta à aplicação de resíduos. A quantificação da biomassa microbiana por meio da determinação do conteúdo de carbono (CBM) permite detectar mais rapidamente as perturbações sofridas no equilíbrio biológico do solo decorrentes do manejo adotado, pois reage com mais rapidez que os atributos físicos e químicos (Powlson et al., 1987).

Normalmente, para se avaliar o efeito da aplicação de resíduos sobre a comunidade microbiana do solo, determina-se o CBM e fazem-se avaliações

quantitativas das espécies de microrganismos presentes. Mais recentemente, as similaridades e diversidades da biota do solo têm sido avaliadas por determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), métodos de PCR do rDNA 16S (PCR-DGGE) e métodos de alta resolução, utilizando grupamentos de seqüências de 16S rDNA (OFRG). Um lodo de esgoto com baixos níveis de metais pesados pode causar pouca variação na estrutura da comunidade de bactérias em relação ao tratamento testemunha e ao tratamento que recebeu lodo de esgoto com maior concentração de metais pesados (Souza, 2002).

A aplicação de  $370 \text{ Mg ha}^{-1}$  de lodo de esgoto ao solo não afetou a comunidade de bactérias e de desnitrificadores, aumentou o número de actinomicetos e de fungos e diminuiu a comunidade de *Azotobacter* spp. (Melo et al., 2002a). Doses de lodo de esgoto de até  $160 \text{ Mg ha}^{-1}$ , aplicadas à cultura do tomateiro, não influenciaram o conteúdo de CBM, porém causaram aumento na comunidade de bactérias e de fungos (Lima, 1994). Também Guerrero et al. (2002a) avaliaram o efeito da aplicação de lodo de esgoto, compostado ou não, sobre o CBM de solos degradados. Em solo degradado por exploração agrícola intensiva, o CBM aos 330 dias após a aplicação de  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  lodo de esgoto não compostado variou de 121 a  $505 \text{ mg kg}^{-1}$  para solos tratados e não tratados, respectivamente. Em solo degradado por condições climáticas e pastagem, os resultados foram cerca de 2,3 vezes maiores nos tratamentos que receberam lodo de esgoto em relação ao tratamento testemunha.

Em Latossolo Vermelho-amarelo cultivado com eucalipto, somente foram observados efeitos da adição de lodo de esgoto nos microrganismos do solo nas doses elevadas, sendo que a BMS, o número de bactérias e de amonificadores refletiram a aplicação do lodo de esgoto, enquanto o número de fungos foi sensível somente nos primeiros 120 dias (Fortes Neto, 2000).

É preciso considerar que a avaliação da BMS isoladamente pode levar a conclusões falsas, uma vez que, como resultado da aplicação do resíduo, um determinado grupo de organismos pode não ser influenciado, enquanto outros podem sofrer efeitos positivos ou negativos, e a BMS, que representa a soma das biomassas individuais, pode ser a mesma ou até mesmo maior. Além disso, a biomassa microbiana do solo inclui o C de microrganismos mortos, uma vez que o método de extração do CBM não faz distinção entre microrganismos vivos e mortos. Assim, recomenda-se a avaliação conjunta da biomassa microbiana e de atividades específicas, como a atividade de enzimas dos ciclos biogeoquímicos do C, N, P, S ou avaliações da atividade biológica, como a atividade respiratória. A aplicação de uma dose de 3% de lodo de esgoto causou diminuição na atividade biológica do solo, o que foi atribuído ao efeito salino ou tóxico dos metais pesados (Guerrero et al., 2002b).

A presença de metais pesados nos resíduos pode afetar a BMS, dependendo do metal presente, da concentração e de outros fatores que influenciam sua disponibilidade. Segundo Chander & Brookes (1991), os metais pesados afetam a BMS na seguinte ordem:  $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd}$ . Para os autores, a relação CBM/CO (carbono orgânico) é um bom índice para avaliar o efeito dos metais.

Para se avaliar o efeito da concentração de um determinado metal presente no lodo de esgoto sobre a BMS seria necessário empregar lodos com ampla gama de variação na concentração do metal de interesse, mas com a mesma composição nos demais constituintes, o que é impossível de se conseguir nas ETEs. Dessa forma, uma das maneiras de realizar o estudo é contaminar artificialmente o lodo com o metal desejado, mas considerando-se que o tipo de substância portadora do metal (cloreto, sulfato, nitrato) pode influenciar os resultados a serem obtidos. Também é impossível atingir a mesma forma de complexação com que o metal chega a um lodo de esgoto produzido em uma ETE. Para diminuir esse efeito, pode-se fazer uma incubação prévia do sal portador do metal com o lodo de esgoto, por um determinado período de tempo.

Silva et al. (1996) adicionaram, em condições de casa-de-vegetação,  $40 \text{ Mg ha}^{-1}$  de lodo de esgoto previamente contaminado com 100, 300, 900 e  $2700 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{3+}$  a um LVd, verificando que o metal não influenciou o CBM em três épocas de amostragem (imediatamente após a incorporação, 90 e 158 dias após). Os autores atribuíram os resultados à complexação do Cr pela MO (matéria orgânica) do lodo de esgoto, tornando-o indisponível para os microrganismos, e também pelo fato do  $\text{Cr}^{3+}$  não ser a forma mais tóxica do metal. Em experimento semelhante, em solo LVef, Silva et al. (1997) constataram que a BMS foi modificada pela dose de Cr, pela profundidade e pela época de amostragem, sendo que doses de Cr acima de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de lodo foram tóxicas aos microrganismos, efeito que desapareceu aos 210 dias após a aplicação do resíduo. Os resultados deixam claro que a concentração de metal tóxica aos organismos é influenciada pelas características do solo e pelo tempo de permanência do resíduo no solo.

Silva et al. (1999) contaminaram um LVef com 200, 400 e  $600 \text{ mg Pb kg}^{-1}$  na forma de cloreto de chumbo e cultivaram aveia-preta. Aos 104 dias após a contaminação (60 dias após a semeadura da aveia-preta) não observaram efeito sobre o CBM e NBM (nitrogênio da biomassa microbiana) do solo. Entretanto, a aplicação de lodo de ETA a solo degradado pode causar aumento no CBM e NBM (Tabela 11). Esse efeito está associado ao aumento no teor de argila e o conseqüente aumento na capacidade de adsorção de compostos orgânicos, de nutrientes e de metais, maior capacidade tampão e proteção dos microrganismos contra predadores (Gama-Rodrigues, 1999).

A atividade biológica do solo pode ser estimada por uma série de métodos, sendo os mais comuns a respirometria e a atividade de enzimas como a desidrogenase e o potencial de hidrólise do FDA (diacetato de fluoresceína).

A diversidade e a intensidade dos processos metabólicos observados em solo que recebeu doses elevadas de lodo de esgoto no início do período de incubação são indicativas de estímulo à microbiota nativa e da contribuição de novas células microbianas (Lopes, 2001).

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a adição de resíduos ricos em material orgânico altera o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) do solo. Por outro lado, a origem do esgoto, o método utilizado no seu tratamento e tratamentos posteriores aplicados ao lodo de esgoto obtido, como a compostagem, determinam respostas diferentes do solo em relação à atividade respiratória.

**Tabela 11.** CBM e NBM em solo degradado pela mineração de cassiterita 30 dias após adição de lodo de ETA. <sup>(1)</sup>

Tratamento	Biomassa microbiana	
	C	N
	mg 100g <sup>-1</sup> solo	
Ta	0b	0 c
Tq	0b	0 c
D1	11,90 b	1,27 ab
D2	32,49 a	1,26 b
D3	31,31 a	1,73 a

<sup>(1)</sup> Ta= testemunha absoluta, Tq= testemunha química, D1, D2 e D3= 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> solo de N-LETA, respectivamente (base seca). Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. (Fonte: Teixeira, 2004).

Um dos tratamentos aplicados ao lodo de esgoto com a finalidade de diminuir o conteúdo em agentes patogênicos é a compostagem, que determina modificações sensíveis na constituição do resíduo e nos efeitos de sua aplicação ao solo (Melo et al., 2003; Cintra, 2005). Guerrero et al. (2002a) observaram que o lodo compostado causou menor aumento na atividade respiratória que o lodo não compostado. A adição de 30 Mg ha<sup>-1</sup> de lodo de esgoto, compostado ou não, a um solo degradado por agricultura intensiva causou aumento no valor de qCO<sub>2</sub> em relação ao tratamento testemunha. Aos 437 dias após a incorporação, o tipo de lodo não alterou os valores de qCO<sub>2</sub>, que foram em média 2,8 vezes maiores que o tratamento testemunha.

À adição de doses de lodo de esgoto de até 48 Mg ha<sup>-1</sup> em um solo argiloso causou aumento transitório na atividade respiratória, sendo que os valores mais elevados de qCO<sub>2</sub> nos tratamentos que receberam lodo indicaram um efeito estressante sobre a microbiota e sucessão de populações microbianas (Lopes, 2001). Houve um estímulo a atividades metabólicas não existentes no solo original e perda de outras atividades no final do período de incubação, sugerindo a ocorrência de distúrbios na fisiologia dos microrganismos do solo.

Em Latossolo Vermelho-amarelo cultivado com eucalipto, impacto sobre os microrganismos e a atividade biológica do solo somente foi observado em doses elevadas de um lodo de esgoto rico em metais pesados, sendo que a atividade respiratória e o quociente metabólico representaram com maior confiabilidade a decomposição do resíduo (Fortes Neto, 2000).

Considerando-se que a principal fonte de enzimas para o solo são os componentes da biota, com o aumento da BMS deve ocorrer aumento na atividade enzimática, o que a torna um indicador da atividade biológica do solo. Enzimas podem ser excelentes indicadores da qualidade do solo pela rápida resposta às alterações do ambiente (Gregorich et al., 1997). Dar (1996) observou diminuição na atividade enzimática de solos com concentrações elevadas de cádmio como efeito da aplicação de lodo de esgoto.

Em estudos sobre enzimas do solo é necessário tomar cuidado com aquilo que está sendo avaliado, ou seja, com o método empregado na determinação da atividade da enzima. No solo encontram-se enzimas bióticas e abióticas. As enzimas bióticas são as que fazem parte da estrutura dos organismos vivos, podendo ser intra ou extracelulares. As enzimas abióticas são aquelas que não mais pertencem à estrutura de um organismo vivo, mas que, complexadas pelos colóides do solo, podem manter-se ativas por longos períodos de tempo. Dessa forma, quando o método inclui as enzimas abióticas, a atividade determinada não se refere a de organismos vivos e também não reflete o momento da avaliação, não se sabendo exatamente há quanto tempo aquela enzima foi sintetizada e, portanto, a que época se refere a atividade medida.

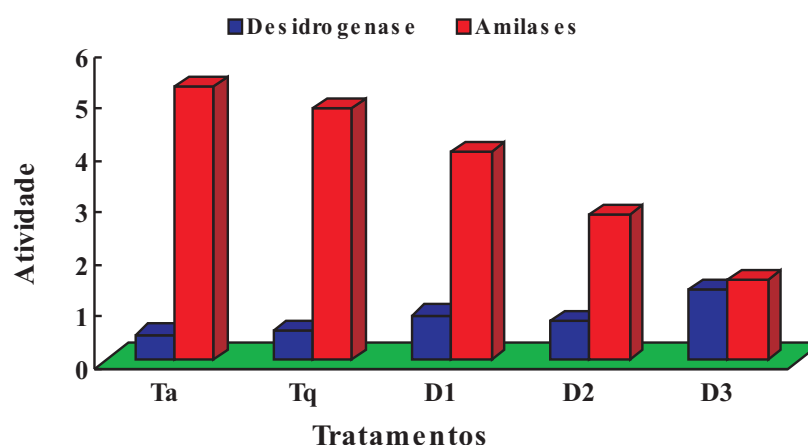
De um modo geral, dependendo da composição química, o lodo de esgoto, compostado ou não, tem causado aumento na atividade enzimática do solo. Segundo Stroo & Jenckes (1985), a atividade de amilases pode ser usada como indicador da atividade biológica do solo.

Em um Latossolo Vermelho-amarelo cultivado com eucalipto e tratado com lodo de esgoto rico em metais, a atividade celulolítica correlacionou-se com a decomposição do resíduo, mas o potencial de hidrólise do FDA não foi eficiente para quantificar a atividade microbiana durante a biodegradação (Fortes Neto, 2000). A adição de composto de lodo de esgoto na dose de  $60 \text{ g kg}^{-1}$  a um solo franco arenoso, pobre em matéria orgânica e nitrogênio, causou aumento nas atividades de catalase, urease e fosfatase (Bustamante-Munõz et al., 2002).

Silva et al. (1996) e Teixeira et al. (1996) adicionaram  $40 \text{ Mg ha}^{-1}$  de um lodo de esgoto previamente contaminado com  $\text{Cr}^{3+}$  (100, 300, 900 e  $2700 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a um LVd e não encontraram efeito sobre a atividade de amilases em 3 épocas de amostragem (imediatamente após a aplicação, aos 90 e aos 158 dias após), resultado coerente com o fato de não ter havido efeito também sobre a biomassa microbiana. A atividade de arilsulfatase aumentou na amostragem logo após a incorporação e diminuiu na maior dose de Cr nas amostragens aos 90 e aos 158 dias após a incorporação do lodo de esgoto. A atividade de urease foi maior na camada 10-20 cm do tratamento testemunha, o que foi atribuído a um efeito da migração do  $\text{Cr}^{3+}$  para essa camada. Contudo, em experimento de campo em que o solo foi tratado com  $40 \text{ Mg ha}^{-1}$  lodo de esgoto (base seca) contaminado com  $\text{Cr}^{3+}$  (100, 300, 900 e  $2700 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e cultivado com sorgo, Bertipaglia et al. (1999) observaram que a contaminação com  $300 \text{ mg Cr}^{+3} \text{ kg}^{-1}$  causou um pico na atividade de amilases aos 64 e 104 dias após a aplicação do resíduo, sem ocorrer pico correspondente na BMS.

Revoredo e Melo (2007) avaliaram o efeito de lodo contaminado artificialmente com Ni (329, 502, 746 e  $1119 \text{ mg kg}^{-1}$ , base seca) sobre a BMS e a atividade enzimática de um LVd cultivado com sorgo, encontrando que o CBM, o NBM e a atividade de fosfatases (ácida e alcalina) foram bons indicadores para avaliar o impacto causado pelo metal pesado.

A atividade de amilases diminuiu em solo degradado que recebeu doses crescentes de LETA, enquanto a atividade de desidrogenases apresentou um pequeno aumento (Teixeira, 2004), como mostrado na figura 6.



**Figura 6.** Atividade de desidrogenases e amilases em solo degradado pela mineração de cassiterita 30 dias após a aplicação de lodo de ETA. Ta= testemunha absoluta, Tq= testemunha química, D1, D2 e D3= 100, 150 e 200 mg kg<sup>-1</sup> solo de N-LETA, respectivamente (base seca). Fonte: (Teixeira, 2004).

O efeito da adição de lodo de esgoto e lodo de ETA sobre a BMS e a atividade enzimática mostra que, em condições de estresse, os organismos do solo podem, de modo a garantir o estado vital, aumentar a atividade metabólica, o que ocasiona aumento na atividade de algumas enzimas sem o correspondente aumento na BMS. As enzimas que assim se comportam também podem ser boas indicadoras da presença do fator causador do estresse. Entretanto, a resposta à aplicação de lodos não tem levado a um denominador comum, não sendo ainda definido um único atributo que caracterize o impacto negativo causado pela presença de metais pesados no lodo.

### 3.3. Efeitos Sobre as Plantas

Os efeitos da aplicação de resíduos sobre as propriedades do solo refletem no desenvolvimento e produtividade das culturas. Os efeitos podem ser positivos, com aumento na produtividade, ou negativos, com diminuição na produtividade e até mesmo com a morte das plantas. Revisões bibliográficas sobre os efeitos do uso de resíduos em áreas agrícolas, com especial atenção para lodo de esgoto, foi realizada por Melo et al. (2002a) e por Marques et al. (2002).

Com relação aos efeitos do uso agrícola do lodo de ETA sobre o estado nutricional das plantas e os reflexos na produtividade ainda há poucas informações disponíveis. A aplicação de lodo de ETA não causou aumento na produção de matéria seca, a qual diminuiu na ausência de complementação mineral (Skene et al., 1995). Contudo, Teixeira et al. (2007) aplicaram lodo de ETA (coagulante sulfato de alumínio) em solo cultivado com feijoeiro, observando desenvolvimento das plantas equivalente ao do tratamento testemunha, que recebeu fertilização mineral completa (Figura 7). Em solo degradado pela mineração de cassiterita, plantas como girassol, cássia verrugosa, taxi-branco, milheto, mucuna-preta, feijão-de-porco e braquiária não apresentaram bom desenvolvimento, ocorrendo, inclusive, morte de plantas.



Nesse experimento, as plantas de mucuna-preta apresentaram bom desenvolvimento até os 30 dias após a semeadura, mas, em seguida, passaram a apresentar manchas escuras nas folhas (Figura 8), engrossamento das folhas mais novas e queda das folhas mais velhas, culminando com um florescimento precoce. Há que se considerar, contudo, que as doses de lodo de ETA foram muito elevadas, uma vez que se utilizou o resíduo como fonte de N (Teixeira et al., 2007).



**Figura 7.** Plantas de feijão submetidas à fertilização mineral, à esquerda, e tratadas com lodo de ETA complementado com fertilização mineral, à direita.



**Figura 8.** Plantas de milho e girassol (à esquerda) e de mucuna-preta (à direita) cultivadas em solo degradado pela mineração de cassiterita tratado com lodo de ETA.

## 4. Conclusão

De modo geral, os resíduos ricos em material orgânico apresentam potencial para uso na agricultura, mas os benefícios e os riscos ambientais e à saúde do homem e dos animais irão depender de sua composição em elementos tóxicos, das condições edafoclimáticas e da planta objeto da exploração agrícola. São esses fatores que definirão, também, a dose a ser aplicada e por quantas vezes a aplicação poderá ser repetida.

O lodo de esgoto apresenta elevado potencial para uso em áreas agrícolas como condicionador das propriedades físicas do solo e como fonte de nutrientes para as plantas. Contudo, ainda há falta de experimentos em condições de campo e de longa duração para solos e clima brasileiros, que permitam o estabelecimento de uma legislação segura para regular tal destinação. Até o presente momento, as informações disponíveis sobre o comportamento dos metais pesados no solo e sua distribuição nas plantas cultivadas são insuficientes para avaliação segura dos riscos. Ainda em relação ao lodo de esgoto, outro problema a ser resolvido é a higienização e desidratação, de modo a tornar mais segura a aplicação e permitir o transporte a distâncias mais longas.

O uso do lodo de ETA na agricultura constitui desafio maior, tendo em vista os métodos utilizados no tratamento da água, que o enriquece em metais tóxicos às plantas e prejudiciais às propriedades do solo. Trata-se de um resíduo rico em cloretos, que pode ser rico em Fe ou Al (dependendo do processo de tratamento adotado) e apresentar potencial para elevar o pH do solo a valores muito altos, o que tornaria indisponível para as plantas nutrientes como o fósforo e a maioria dos micronutrientes. Ademais, é um resíduo pobre em matéria orgânica com elevado conteúdo em silte e argila, o que pode causar danos às propriedades físicas do solo. Finalmente, seu alto teor em umidade encarece o transporte até as áreas de aplicação. As poucas informações sobre seu uso na agricultura e os resultados incipientes mostram que, devidamente manejado, poderá vir a se constituir em outra opção para melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, com potencial para uso na recuperação de solos degradados ou potencialmente improdutivos devido às propriedades físicas inadequadas.

## Referências

AGUIAR, P. de S.; MELO, W.J.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P. Nickel in the humic substances of a soil treated with sewage sludge for six years. XII INTERNATIONAL MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY. São Pedro, SP, Brasil, 25 a 30 de julho de 2004. Abstracts, p. 80.

ANGERS, D.A.; BISSONNETTE, N.; LÈGÈRE, S.; SAMSOM, N. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Can. J. Soil Sci.**, v. 73. p. 39-50, 1993.

AWWA: U.S.EPA. Land application of water treatment sludges: impacts and management. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. 1990. 100p.

BERTIPAGLIA, L.M.A.; MELO, G.M.P.; MELO, W.J. Soil microbial biomass and amylase activity in a soil treated with a sewage sludge enriched with Cr. In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Viena, Áustria, 11 a 15 de julho de 1999. In: Proceeding of Extended Abstracts, vol II, p. 752-753.

BERTON, R.S.; CAMARGO, A.O.; VALADARES, J.M.A.S. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de biossólido a cinco solos paulistas. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.13, p.187-192, 1989.

BERTON, R.S.; VALADARES, J.M.A.S.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Peletização de biossólido e adição de CaCO<sub>3</sub> na produção de matéria seca e absorção de Zn, Cu e Ni pelo milho em três latossolos. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v. 21, p.685-691, 1997.

BUGBEE G.J. & FRINK, C.R. Alum sludge as a soil amendment: Effects on soil properties and Plant Growth. Connecticut Agricultural Experiment Station, Bulletin 827, 1985.

BUSTAMANTE-MUNÓZ, M.A.; GÓMES-LICAS, I.; CASADO-VELA, J.; NAVARRO-PEDREÑO, J.; MATAIX-SOLERA, J.; GARCIA, F. Influence of sewage sludge compost on biological activity in soils. In: SUSTAINABLE USE AND MANAGEMENT OF SOILS IN ARID AND SEMIARID REGIONS. Cartagena, Espanha, 23 a 27 de outubro de 2002. p. 114-115.

CHANDER, K. & BROOKES, P.C. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.23, p.927-932, 1991.

CINTRA, A.A.D. Compostagem de lodo de esgoto e esterco de curral com bagaço de cana e produção de brócolis e tomate. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 2005. 83p. (Tese de Doutorado).

COMPARINI, J.B. & SOBRINHO, P.A. Decaimento de patógenos em biossólidos submetidos à secagem em estufa agrícola. In: Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. AIDIS. Gestión inteligente de los recursos naturales: desarrollo y salud. México, D.F. FEMISCA, 2002. p. 1-8.

CRAVO, M.S.; MURAOKA, T.; GINE, M.F. Caracterização química de compostos de lixo urbano de algumas usinas brasileiras. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.22, p.547-553, 1998.

CRIPPS, R.W.; WINFREE, S.K.; REAGAN, J.L. Effects of sewage sludge application method on corn production. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.25, p.1705-1715, 1992.

CUNNINGHAM, J.D.; KEENEY, D.R.; RYAN, J.A. Yield and metal composition of crop and rye grown on sewage amended soil. **J. Environ. Qual.**, v.4, p.448-454, 1975.

DAR, G. H. Effects of cadmium and sewage-sludge on soil microbial biomass and enzyme activities. **Bioresource Technology**, v. 56, p. 141-145, 1996.

EPA (Environmental Protection Agency). Land application of municipal sludge. Cincinnati, 1985. 432p.

FORTES NETO, P. Degradação de biossólido incorporado ao solo avaliada através de medidas microbiológicas. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000. 113p. (Tese de Doutorado).

GAMA-RODRIGUES, E.F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A. & CAMARGO, F.A.O. (eds.). **Fundamentos da material orgânica**. Porto Alegre, Gênese, 1999. p. 228-243.

- GILLER, K.E.; WITTER, E.; Mc GRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, n. 10/11. p.1389-1414, 1998.
- GREGORICH, E. G.; CARTER, M. R.; DORAN, J. W.; PANKHURST, C. E.; DWYER, L. M. Biological attributes of soil quality. In: GREGORICH, E. G. & CARTER, M. R. (eds.) **Soil quality for crop production and ecosystem health**. Amsterdam: Elsevier, 1997. Developments in Soil Science 25. p. 81-113.
- GUERRERO, C.; NAVARRO-PEDRENO, J.; AYGADE, H.; MOSTÓ, A.; GÓMEZ, I. Microbial biomass and activity in sewage-sludge amended soils. SUSTAINABLE USE AND MANAGEMENT OF SOILS IN ARID AND SEMIRARID REGIONS. Cartagena, Espanha, 23 a 27 de outubro de 2002a. p. 93-94.
- GUERRERO, C.; FERNÁNDEZ-GETINO, A.P.; GASCÓ, J.M. Influence of different sewage sludge rates on the Holm Oak soil respiration. SUSTAINABLE USE AND MANAGEMENT OF SOILS IN ARID AND SEMIRARID REGIONS. Cartagena, Espanha, 23-27 de outubro de 2002b. p. 159-161.
- HEIL, D. M. & BARBARICK K. A. Water treatment sludge influence on the growth of sorghum-sudangrass. **J. Environ. Qual.**, v. 18, p. 292-298, 1989.
- HORWATH, W.R. & PAUL, E.A. Microbial biomass. In: WEAVER, R.W. (ed.) **Methods of Soil Analysis**. Part 2. **Microbiological and biochemical properties**. Soil Science Society of America book series no. 5, p. 753-773. 1994.
- JORGE, J.A.; CAMARGO, O.A.; VALADARES, J.M.A.S. Condições físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro quatro anos após aplicação de biossólido e calcário. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.15, p.237-240, 1991.
- LIMA, J.A. Influência de biossólido e fósforo nos microrganismos e suas atividades e no acúmulo de metais pesados em tomateiro. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1994. 164p. (Tese de Doutorado).
- LOPES, E.B.M. Diversidade metabólica em solo tratado com biossólidos. Piracicaba, ESAL/USP, 2001. 65p. (Dissertação de Mestrado).
- MARCIANO, C.R. Incorporação de resíduos urbanos e as propriedades físico-hídricas de um Latossolo Vermelho-Amarelo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1999. 93p. (Tese de Doutorado).
- MARQUES, M.O. Incorporação de biossólido em solo cultivado com cana-de-açúcar. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1997. 111p (Tese de Livre Docência).
- MARQUES, M.O.; MELO, W.J.; MARQUES, T.A. Metais pesados e o uso de biossólidos na agricultura. In: TSUTYIA, M.T. et al. (eds). **Biossólido na Agricultura**. Capítulo 12. 2ª ed., São Paulo, ABES-SP, 2002, p. 365-403.
- MELO, V.P. Propriedades químicas e disponibilidade de metais pesados para a cultura do milho em dois latossolos que receberam a adição de biossólido. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 2002. 134p. (Dissertação de Mestrado).
- MELO, V.P. Carbono, nitrogênio e atividade biológica em latossolos cultivados com milho, no sexto ano de aplicação de lodo de esgoto. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 2006. 93p. (Tese de Doutorado).

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R.A.; LEITE, S.A.S. Efeito de doses crescentes de bio sólido sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.18, p.449-455, 1994.

MELO, V.P.; BEUTLER, A.N.; SOUZA, Z.M. de; CENTURION, J.F.; MELO, W.J. Atributos físicos de latossolos adubados durante cinco anos com bio sólido. **Pesq. agropec. bras.** v. 39, n. 1, p.:67-72, 2004.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P. O uso agrícola do bio sólido e as propriedades do solo. In: TSUTUYIA, M.T. et al. (eds). **Bio sólido na Agricultura**. Capítulo 11. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo, ABES-SP, 2002a. p. 289-363.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; FERREIRA, M.E.; MELO, G.M.P.; MELO, V.P. Chemical properties and enzyme activity in a sewage sludge treated soil. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 33, n. 9 e 10, p. 1643-1659, 2002b.

MELO, W.J.; CINTRA, A.A.D.; REVOREDO, M.D.; BRAZ, L.T. Heavy metals nutrients in tomato plants cultivated in soil amended with biosolid composts. **Acta Hort.**, v. 627, p. :203-209, 2003.

OLIVEIRA, F.C. Metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com bio sólido. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 90p. (Dissertação de Mestrado).

OLIVEIRA, K.W.; MELO, W.J.; PEREIRA, G.T.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P. Heavy metals in Oxisols amended with biosolids and cropped with maize in a long term experiment. **Scientia Agrícola**, v. 62, n. 4, p. 381-388, 2005.

ORTEGA, E.; NOGALES, R.; DELGADO, M. Modificación en la porosidad de un suelo por la adición de un compost de basura urbana. **Analogica, Edafologica. y Agrobiologica**, v.15, p.1735-1747, 1981.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, E.T. Measurement of soil microbial biomass processes an early indication of changes in total organic matter due to straw incorporation. **Soil Biol. Biochem.**, v. 19, p.:150-164, 1987.

RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. In: *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. Campinas, Instituto Agronômico-FUNDAG, 1997. p. 31. (Boletim Técnico 100).

REVOREDO, M.D.; MELO, W.J. Enzyme activity and microbial biomass in na oxisol amended with sewage sludge contaminated with nickel. **Scientia Agrícola**, v.64, n.1, p.61-67, 2007.

ROS, C.O. da; AITA, C.; CERETTA, C.A.; FRIES, M .R. Bio sólido: efeito imediato no milheto e residual na associação aveia-preta-ervilhaca. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.17, p.257-261, 1993.

ROSS, S.M. Source and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. In: ROSS, S.M. (ed.), **Trace metals in soil-plant systems**. New York, John Willey and Sons, 1994. p. 3-25.

SANEPAR. Disponível em: <<http://www.sanepar.pr.gov/prosab/prosabm.nsf/Chave/Redes?Open Document>>. Acesso em 27/12/2001.

SASTRE, I.; VICENTE, M.A.; LOBE, M.C. Influence of the application of sewage sludge on soil microbial activity. **Bioresour. Technology**, v. 57, p. 19-23, 1996.

SILVA, E.T. Atributos químicos e biológicos de um solo da Região Amazônica degradado pela mineração de cassiterita após aplicação de lodo de Estação de Tratamento de Água. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 2004. 86p. (Tese de Doutorado).

SILVA, E.T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T.; LEITE, S.A.S.; CHELLI, R.A. Biomassa microbiana e atividade de amilase em Latossolo Vermelho-escuro acrescido de lodo de esgoto contaminado com doses crescentes de crômio. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13. Águas de Lindóia, SP, 4 a 8 de agosto de 1996. CD Rom.

SILVA, E.T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T.; LEITE, S.A.S.; CHELLI, R.A. Efeito do lodo de esgoto, contaminado com doses crescentes de crômio, sobre formas de nitrogênio no solo e atividade de urease. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro, RJ, 20 a 26 de julho de 1997. CD Rom.

SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S.; ZOTELLI, H.B.; PEIXE, C.A.; MENDONÇA, E. Cana-de-açúcar cultivada em solo adubado com biossólido. *Pesq. agropec. bras.*, v. 1, p. 1-8, 1988.

SILVA, E.T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T.; SANTOS, C.C. Matéria orgânica e biomassa microbiana em solo contaminado por Pb e cultivado com aveia-preta (*Avena spp*). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE LA CIENCIA DEL SUELO, 14. Pucon, Chile, 8 a 12 de novembro de 1999. In CD Rom.

SILVA, E.T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T. Chemical attributes of a degraded soil after application of water treatment sludges. **Scientia Agricola**, v.62, n.6, p.559-563, 2005.

SKENE, T.M.; OADES, J.M.; KILMORE, G. Water treatment sludge: a potential plant growth medium. **Soil Use and Management**, v. 11, p. 29-33, 1995.

SOUZA, A. G. de. Diversidade e estrutura de comunidades de bactéria em solos tratados com biossólidos. Piracicaba, ESAL/USP, 2002. 176 p. (Tese de Doutorado).

STROO, H.F. & JENCKES, E.M. Effects of sewage sludge in microbial activity in and old abandoned mine soil. **J. Environ. Qual.**, v.14, n.3, p.301-304, 1985.

TEIXEIRA, S.T. Aplicação do lodo de Estação de Tratamento de Água em solo degradado por mineração de cassiterita. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 2004. 85p. (Tese de Doutorado).

TEIXEIRA, S.T.; MELO, W.J.; SILVA, E.T.; CHELLI, R.A.; LEITE, S.A.S. Atividade de arilsulfatase e teor de S-sulfato em Latossolo Vermelho-escuro acrescido de lodo de esgoto contaminado com doses crescentes de crômio. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13. Águas de Lindóia, SP, 4 a 8 de agosto de 1996. In CD Rom.

TEIXEIRA, S.T.; MELO, W.J.; SILVA, E.T. Plant nutrients in a degraded soil treated with water treatment sludge and cultivated with grasses and leguminous plants. **Soil Biol. Biochem.**, v.39, p.1348-1354, 2007.

# Capítulo 16

## Indicadores Microbiológicos e Padrões de Qualidade de Água

Suely MARTINELLI <sup>(1)</sup>

### 1. Introdução

O aumento da demanda do uso e consumo de água no planeta e sua contaminação por atividades desenvolvidas pelo homem moderno tem mobilizado órgãos governamentais, a sociedade civil e acadêmica no sentido de preservar sua qualidade e garantir sua disponibilidade para gerações futuras. A presença de microrganismos patogênicos na água de consumo, causando riscos para a saúde humana, apresentou a necessidade de se promover uma vigilância eficiente e constante na fonte utilizada para abastecimento e sua distribuição, além do desenvolvimento de sistemas de tratamento e desinfecção da água bruta. No princípio, a escolha do indicador de contaminação fecal (*Escherichia coli*) foi universalmente reconhecida como uma condição indicativa da presença de patógenos potenciais. Frequentemente, tais patógenos podem alcançar os corpos d'água através de lançamento intermitente junto a despejos de esgotos sanitários. Hoje, com avanços tecnológicos para se identificar patógenos e conhecendo-se sua biologia, interações com outros microrganismos e o ambiente, evidências de outras doenças de veiculação hídrica, incremento no número de pessoas sensíveis, principalmente os imunodeficientes e debilitados, fica evidente a necessidade de se reavaliarem os padrões de qualidade e as legislações frente à interface existente entre as descobertas científicas e o gerenciamento de ambientes aquáticos que sofreram impacto.

### 2. Recursos Hídricos e a Legislação no Brasil

A poluição de ambientes aquáticos é a causa de uma intensa preocupação quanto à disponibilidade deste recurso natural tão indispensável para a vida, a água. A Terra tem somente 1% de água disponível para uso da população e o Brasil tem 11,6% da água doce superficial do mundo. Destes, 70% estão na Região Amazônica e 30% distribuídas desigualmente pelo país, para atender 93% da população.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisadora - CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Rua São Carlos 287, CEP 13035-420, Campinas, SP.

Sendo os recursos hídricos limitados e nem sempre suficientes para atender a demanda, deve ser assegurado o direito ao uso da água a todos os cidadãos. Além disso, a degradação de sua qualidade, pelo excesso de lançamento de efluentes, prejudicando a comunidade de usuários, ressalta a necessidade de um programa de gestão para a demanda e sua disponibilidade. Em função disso, têm se desenvolvido ações reguladoras cada vez mais abrangentes para a utilização dos recursos hídricos no Brasil.

A partir da aprovação da Política Nacional dos Recursos Hídricos, em janeiro de 1997, é prioritário o uso da água para consumo humano e a dessedentação de animais em todo o território nacional, e foi transferida para os Estados a responsabilidade da regulamentação dos recursos hídricos do subsolo e dos rios sob sua jurisdição (Lei Nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997 citada em Brasil, 2001a). A referida lei institui um licenciamento obrigatório, a outorga, que, além de assegurar legalmente o direito ao uso temporário ou provisório das águas, fornece subsídios para gerenciar e proteger os recursos hídricos. A Política de Recursos Hídricos no Brasil instituiu ainda a criação de uma unidade territorial de gerenciamento - a Bacia Hidrográfica - participando no sistema através de Comitês de Bacias Hidrográficas, combinando a atuação de representantes da União, dos Estados e Municípios, bem como usuários das águas em sua área de atuação.

Assim, um sistema gestor dos recursos hídricos foi implantado desde então, com a criação de órgãos especializados dentro dos estados e municípios, da participação do Poder Público, dos usuários e das comunidades, objetivando assegurar a disponibilidade de água de qualidade às futuras gerações, utilização racional dos recursos hídricos e diagnosticar antecipadamente eventos hidrológicos críticos de origem natural ou devido ao uso inadequado dos recursos naturais.

### **3. Poluição das Águas e Padrões de Qualidade**

A água, como a encontramos na natureza, contém muitos compostos minerais ou elementos químicos dissolvidos de importância fisiológica, seja como nutrientes ou ativos no equilíbrio físico-químico do organismo humano. Sempre houve uma preocupação constante do homem em relação à qualidade da água e à transmissão de doenças. Na antigüidade - inclusive na Idade Média - os subprodutos da atividade humana, seus dejetos, resíduos domésticos ou de atividades manufatureiras, eram lançados diretamente à superfície dos solos, onde se acumulavam por certo tempo. Somente com as chuvas esse material poderia alcançar, juntamente com elementos nocivos inclusos, o leito dos rios. Isso implicava em elevação da turbidez das águas quando, valendo-se de métodos simplificados de filtração ou sedimentação, tornavam a água com boas características estéticas e aceitável para potabilidade. No entanto, com a prática de sistemas de esgotamento de resíduos, levando-os de maneira contínua aos rios, esses critérios perderam a validade. Desde então o homem tem causado impacto nos ambientes aquáticos e, na maioria das vezes, somente se conscientizando das conseqüências quando a situação se encontra crítica, comprometendo sua própria saúde.



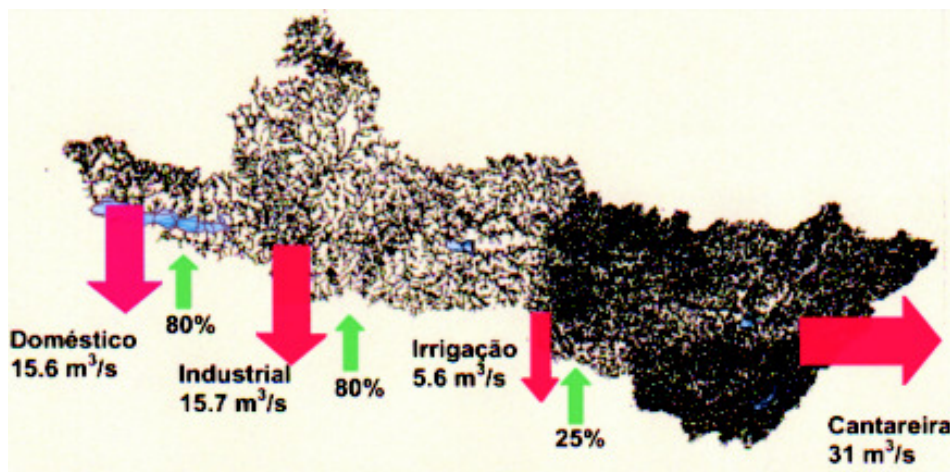
Hoje vemos diminuir a disponibilidade de água de boa qualidade no planeta e em todos os países as restrições para o uso desordenado e garantia da potabilidade da água disponível tem se baseado em padrões ambientais bastante rígidos. A inclusão de compostos químicos no ambiente, pela agricultura ou indústria, e também a introdução excessiva de matéria orgânica oriunda de dejetos humanos em grandes centros urbanizados têm alterado o equilíbrio ecológico dos ambientes aquáticos. As comunidades vivas têm sofrido esse impacto, ora se adaptando, ora desaparecendo por competição e mesmo por condições adversas definitivas do ambiente. A ecologia de ambientes aquáticos tem sido uma ferramenta importante para determinar o acúmulo de substâncias tóxicas em ambientes poluídos. A grande diversidade de composição e freqüência com que os resíduos chegam em corpos d'água sugerem que a melhor maneira de identificá-los é verificar as alterações que produzem nesses corpos receptores. Portanto, são expressivas as alterações na concentração de oxigênio, nutrientes, sólidos e substâncias tóxicas e na temperatura e outros fatores ambientais, que representam níveis de referência de qualidade e são considerados padrões ambientais muito utilizados mundialmente (Branco, 1986). A qualidade das águas encontradas em nosso território é determinada e avaliada quanto a padrões definidos por legislação federal e pela Organização Mundial da Saúde. Muitos Estados possuem legislações específicas utilizadas para determinar a qualidade das águas em suas regiões. Valendo-se desses padrões de qualidade, muitos programas de monitoramento dos recursos hídricos têm sido registrados em todo o Brasil. Esses estudos muitas vezes são contínuos e cumulativos por vários anos, compondo um banco de dados importantíssimo para a região. Como exemplo, o "Relatório Zero" - 2000, documento disponibilizado pelo SIGRH (Sistema de Informações Gerenciais para Recursos Hídricos do Estado de São Paulo), que apresenta um levantamento de dados e informações sobre a situação atual da bacia dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, evidenciando a crise em que se encontram muitos dos mananciais utilizados para abastecer as cidades na região. São muito preocupantes as condições de disponibilidade de água de qualidade na bacia e um balanço hídrico demonstrativo dessa situação é representado na figura 1.

Além de processos intensos de assoreamento pela ocupação desordenada de suas áreas e a alteração de suas características naturais, a região em estudo tem evidenciado condições críticas da qualidade da água de longos trechos de seus rios e reservatórios. O comprometimento da qualidade destas águas deve-se, em grande parte, à quase absoluta falta de tratamento de efluentes urbanos antes de seu lançamento nos corpos receptores.

### **3. Contaminação Microbiana e a Presença de Patógenos na Água**

No passado, investigações epidemiológicas tornaram evidentes a correlação de doenças microbianas, como cólera e febre tifóide, e a transmissão pela água contaminada (Edberg et al., 2000; Szwedzyk, et al. 2000), motivando reavaliação do sistema sanitário para esgoto e água tratada e evidenciando a necessidade de desenvolver meios de proteger a fonte de produção de água para consumo e também sua descontaminação.

As grandes mudanças na engenharia sanitária aconteceram ao mesmo tempo em que se desenvolveu o conhecimento da relação de muitas doenças específicas causadas por microrganismos presentes na água. Segundo informações da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1998), o mais comum risco de saúde associado à água de consumo é a contaminação, direta ou indiretamente por excreta humana ou animal, particularmente fezes. Se a contaminação é recente e se microrganismos responsáveis por ela incluem aqueles que transmitem doenças entéricas, então vários patógenos podem estar presentes na água. A contaminação fecal da água de consumo é somente um dos vários mecanismos pelos quais eles podem ser transmitidos de pessoa a pessoa ou ainda de animais para pessoas. Muitos patógenos causam infecção quando estão em águas utilizadas para banho ou recreação, outros podem causar infecções por inalação quando presentes em aerossóis, como aqueles produzidos por quedas d'água, sistemas de ar condicionado ou sistemas de irrigação de solo agrícola. A identificação de um patógeno específico na água de consumo ou sua ocorrência em uma fonte comum não representam prova de transmissão da doença pela água. Para obter evidência confirmativa, é necessária investigação epidemiológica.



**Figura 1.** Demanda de água na bacia do rio Piracicaba (1996-1997). As setas em vermelho indicam retirada de água e setas em verde indicam o percentual da retirada que retorna à bacia. (Fonte: Projeto Piracena - Cartilha Ambiental Esso).

Craun & Calderon (2001) apresentam um estudo de ocorrências de contaminação em sistemas de abastecimento público nos Estados Unidos relacionado a doenças transmitidas pela água. Um sistema que utiliza quase 90% da água de origem subterrânea, ou seja, uma realidade diferente do que ocorre no Brasil, onde a origem de captação da água distribuída são os mananciais superficiais, grandemente comprometidos e sob impacto constante. Isso é evidenciado quando se constata que 2.875 municípios brasileiros (52% do total) promovem a coleta do esgoto, mas só 575 processam o seu tratamento antes de lançá-lo na água de rios, lagos e no mar; o restante 2.658 (cerca de 48% do total) é desprovido totalmente de rede de esgoto, apesar da informação

de que somente 116 municípios não apresentam um sistema de abastecimento de água disponível aos seus habitantes. É conseqüente o comprometimento do ambiente e dos rios próximos às cidades, que serão a fonte para o abastecimento de água desses próprios municípios (Radar, 2002; Leal, 2002). As estatísticas reforçam a constatação de que o esgoto é o mais precário serviço de saneamento do País, com um atendimento muito desigual entre as várias regiões brasileiras, de acordo com pesquisa desenvolvida pelo IBGE e demonstrada na figura 2.

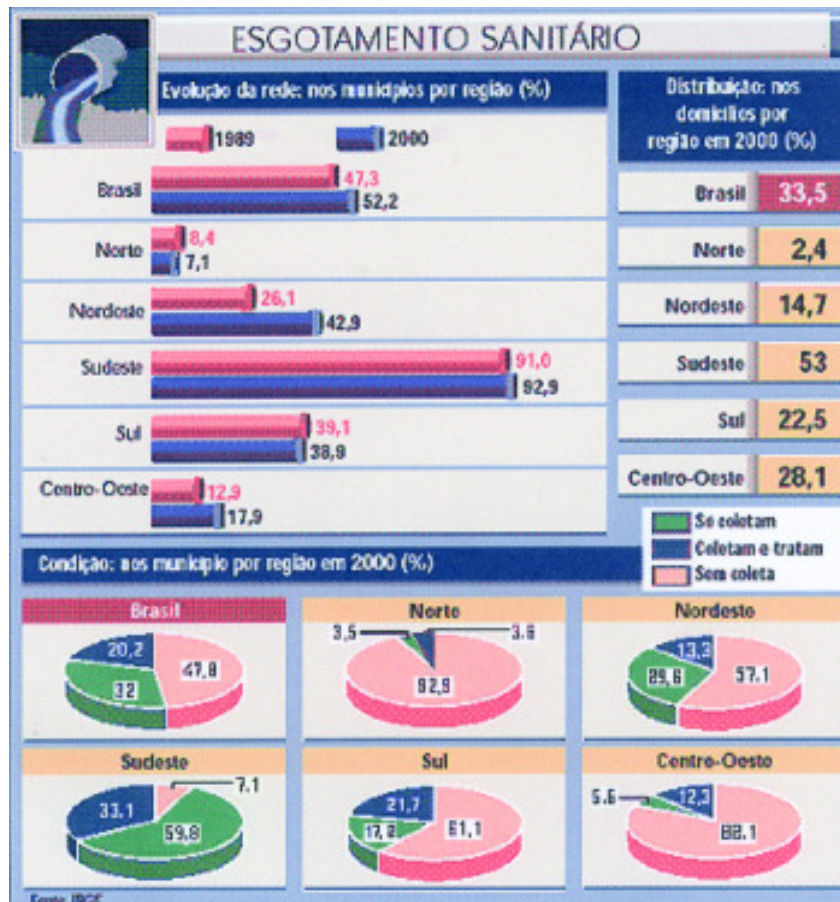


Figura 2. Esgotamento sanitário nas regiões brasileiras. (Adaptado de Leal, 2002).

Embora exista um sistema de vigilância de doenças transmitidas pela água registrado em estudos desenvolvidos nos Estados Unidos, nem sempre elas são reconhecidas ou investigadas, estimando-se que, aproximadamente apenas 10-30% chegam a compor as estatísticas; porém, a exatidão dos casos é relevante para avaliar os riscos e adequar estratégias de proteção à fonte de água frente às tecnologias do tratamento e sua certificação de qualidade para consumo humano. A tabela 1 relata grandes ocorrências causadas por contaminação do sistema de distribuição de água em várias regiões dos Estados Unidos.

**Tabela 1.** Ocorrência de contaminações do sistema de distribuição de água nos EUA. (Adaptado de Craun & Calderon, 2001).

Ano	Estado	Nºcasos	Etiologia	Fonte da água	Deficiencia
1975	Pensilvania	5.000	gastroenterite	-	contaminação na estocagem
1975	Indiana	1.400	gastroenterite	poço	contaminação da tubulação
1975	Puerto Rico	550	gastroenterite	-	contaminação na estocagem
1976	New York	750	salmonelose	poço	falhas nas conexões
1978	Washington	467	virose	poço	falhas nas conexões
1979	Arizona	2.000	giardíase	poço	falhas nas conexões
1980	Georgia	1.500	virose	poço/nascente	falhas nas conexões
1983	Utah	1.272	giardíase	nascente	contaminação tubo avaliado
1983	Washington	750	salmonelose	poço	falhas nas conexões
1993	Missouri	625	salmonelose	poço	contaminação na estocagem
1994	Tennessee	304	giardíase	mista	falhas nas conexões

Segundo os autores, apesar desse universo tão reduzido de informações, a contaminação é a principal responsável pela maioria das ocorrências de doenças transmitidas pela água em sistemas de distribuição pública nos Estados Unidos. Essa incidência elevada de contaminação no sistema de distribuição e estocagem pode resultar, particularmente, da formação de biofilmes, agregados de diferentes espécies de bactérias muito adaptadas ao ambiente de sistemas de tratamento de água, que não apresentam risco para a saúde, mas podem excretar minerais e nutrientes que facilitam a sobrevivência de muitas bactérias, inclusive de patógenos (Szewzyk et al., 2000). É necessário entender as interações entre as bactérias da água e os patógenos, pois sua adaptação e permanência em biofilmes implica supor que nenhuma água potável pode ter a garantia de sua eliminação.

A água potável hoje é considerada um alimento e padrões são estabelecidos para garantir e assegurar sua qualidade. Quanto aos microrganismos, as especificações são para que o conteúdo bacteriano seja muito baixo e não haja detecção de nenhum patógeno. Essa exigência, desenvolvida principalmente para os patógenos clássicos como *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi*, adicionada da prática de segregação das descargas de águas residuárias e o tratamento da água para consumo, tem erradicado as doenças relacionadas a esses patógenos em muitos países, havendo só aparecimentos pontuais em países sem um sistema público disponível de água tratada, ou ainda num sistema ineficiente. No entanto, a descoberta de novos patógenos e o desenvolvimento de estudos em microbiologia da água para consumo alertaram para uma reavaliação da ocorrência de bactérias, vírus e parasitas potencialmente patogênicos na água.

Recentemente, os chamados “patógenos emergentes” têm causado problemas na produção e distribuição de água potável (AWWA Research Division, 1999). Muitos deles são resistentes a condições de estresse ambiental e em baixos níveis de contaminação podem produzir infecções e doenças na população. Dentre eles há os de origem fecal, como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* patogênica, *Yersinia enterocolitica*, novas viroses entéricas e os parasitas *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*; outros incluem espécies de bactérias ambientais que são capazes de crescer em sistemas de distribuição (Szewzyk et al., 2000), como *Legionella spp*, *Aeromonas spp*, *Mycobacterium spp* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Muitos desses patógenos já existiam, mas não eram identificados pelos métodos de detecção disponíveis; outros, mesmo sendo conhecidos, não estavam associados à água de consumo e o seu surgimento deve-se a mudanças nos hábitos de uso da água, como por exemplo, o caso do uso de água aquecida armazenada em reservatórios domiciliares, sendo um ambiente ideal para *Legionella spp*, aumentando o risco de infecções. Também *P. aeruginosa* é capaz de usar instalações caseiras e reservatórios como novos habitats, atribuindo novos riscos para consumidores susceptíveis. Outro fator importante para a emergência de novos patógenos é o aumento do número de pessoas susceptíveis a infecções, incluindo os imunodeficientes, como os pacientes com AIDS, os pacientes com câncer recebendo quimioterapia, os transplantados e pessoas mais idosas debilitadas. Acrescentam-se ainda as crianças e os idosos com alto risco de morte por diarreias. Vários desses novos patógenos foram reconhecidos devido ao fato de causarem severas infecções nessas sub-populações (Beraldi et al., 1999). Somente poucos desses patógenos são realmente de origem recente. Além disso, não se deve esquecer a emergência de linhagens resistentes a antibióticos (especialmente para as bactérias), favorecendo a permanência de genes para virulência, como é o exemplo da *E. coli* entero-hemorrágica. A tabela 2 relaciona patógenos humanos transmitidos pela água de consumo, causando infecções com evidências epidemiológicas comprovadas e algumas de suas características, se presentes em águas de abastecimento.

Junto aos novos patógenos transmitidos pela água, tem recebido atenção o crescimento freqüente de cianobactérias em recursos hídricos, associadas a ambientes hiper-eutróficos e constituídas de muitas espécies potencialmente produtoras de toxinas (World Health Organization, 1999; AWWA Research Division, 1999; Szewzyk et al., 2000; Karner et al., 2001).

Atualmente, guias e legislações (desenvolvidos pelo Conselho da União Européia e Organização Mundial da Saúde) determinam que água para consumo pode conter microrganismos patogênicos somente se o risco para adquirir doenças infecciosas esteja abaixo de um limite admitido, não ultrapassando número ou concentrações que causem problemas de saúde para o homem. O cumprimento dessas determinações inclui meios de proteger e um cuidadoso tratamento da água bruta, bem como refinado controle de qualidade dos processos de tratamento. No entanto, a avaliação do comportamento dos patógenos na água é também essencial para embasar melhorias na eficiência dos sistemas de tratamento.

**Tabela 2.** Patógenos transmitidos pela água e sua importância para o abastecimento.

Patógenos	Risco à saúde	Principal modo de transmissão	<sup>(a)</sup> Persistência na água de abastecimento	<sup>(b)</sup> Resistência ao Cloro	<sup>(c)</sup> Dose infectiva relativa
<b>Bactérias</b>					
<i>Campilobacter jejuni</i>	alto	oral	moderada	baixa	moderada
<i>Escherichia coli</i>	alto	oral	moderada	baixa	alta
<i>Salmonella typhi</i>	alto	oral	moderada	baixa	alta
Outras <i>Salmonelas</i>	alto	oral	longa	baixa	alta
<i>Shigella spp</i>	alto	oral	curta	baixa	moderada
<i>Vibrio cholerae</i>	alto	oral	curta	baixa	alta
<i>Yersinia enterocolitica</i>	alto	oral	longa	baixa	alta (?)
<i>Legionella spp</i>	moderado	inalação	multiplica-se	moderada	alta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	moderado	inalação/ contato	multiplica-se	moderada	alta (?)
<i>Aeromonas spp</i>	moderado	oral/ inalação	multiplica-se	baixa	alta (?)
<i>Mycobacterium, atípica</i>	moderado	inalação/ contato	multiplica-se	alta	(?)
<b>Vírus</b>					
Adenovírus	alta	oral/inalação/ contato	?	moderada	baixa
Enterovírus	alta	oral	longa	moderada	baixa
Hepatite A	alta	oral	longa	moderada	baixa
Hepatite E	alta	oral	?	?	baixa
Vírus tipo Norwalk	alta	oral	?	?	baixa
Rotavírus	alta	oral	?	?	moderada
<b>Protozoários</b>					
<i>Entamoeba histolitica</i>	alta	oral	moderada	alta	baixa
<i>Giardia intestinalis</i>	alta	oral	moderada	alta	baixa
<i>Cryptosporidium parvum</i>	alta	oral	longa	alta	baixa
<i>Acanthamoeba spp</i>	moderada	contato/ inalação	multiplica-se	alta	?
<i>Naegleria fowleri</i>	moderada	contato	multiplica-se	moderada	baixa

Adaptada de World Health Organization, 1998. <sup>(a)</sup> período de detecção para o estágio infectivo em água a 20°C: curta - até 1 semana, moderada - 1 semana a 1 mês, longa- acima de 1 mês; <sup>(b)</sup> avaliação da ação de doses e tempo de contato convencionais na suspensão do estágio infectivo; <sup>(c)</sup> dose exigida para causar infecção em 50% de adultos voluntários saudáveis. ? - não conhecido ou incerto.

#### 4. Indicadores Microbiológicos da Qualidade das Águas Bruta e Tratada

A descoberta de patógenos humanos presentes em águas contaminadas e a necessidade de garantir sua eliminação fizeram com que a prática da desinfecção se estabelecesse até os dias de hoje. No entanto, o monitoramento da eficiência da desinfecção ocasionou o desenvolvimento de técnicas para determinar sua sensibilidade e especificidade. O que poderia melhor proteger a saúde humana: a determinação de patógenos específicos ou o uso de indicadores de contaminação fecal? Esta é uma questão que ainda hoje é freqüentemente abordada e considerada por vários pesquisadores (Fewtrell & Jones, 1992; Edberg et al., 1997; Edberg, et al., 2000; Fujioka & Yoneyama, 2001). A dificuldade em identificar os patógenos, seja por métodos de análise não adequados até o momento, a necessidade de demanda técnica especializada, o surgimento cada vez mais intensificado de novos microrganismos causadores de doenças transmitidas pela água e a procura por métodos de detecção simples e baratos são argumentos que têm feito das bactérias do grupo coliformes os indicadores mais apropriados de contaminação fecal.

Há muito tempo *Escherichia coli* foi escolhida como indicador biológico para a água de consumo, porém, devido a não existência de testes específicos para sua determinação, utilizou-se durante muitos anos a caracterização do grupo coliformes totais, que inclui *E.coli*, compreendendo membros da família *Enterobacteriaceae* capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás. Estudos posteriores revelaram que *E.coli* possui uma termotolerância maior que as outras bactérias fermentadoras da lactose e foi possível desenvolver um método para segregar, dentro do grupo, aquelas que foram denominadas coliformes fecais. No entanto, verificou-se que muitos dos coliformes fecais isolados de sistemas de distribuição de água continham membros do gênero *Klebsiella*, que, não sendo de origem exclusivamente fecal, produziam resultados falso positivos para as determinações. Na última década, estudos referenciam o uso de nova tecnologia e método para detectar e identificar *E.coli* em água de consumo. Hoje, é recomendado o uso da tecnologia de substrato definido contendo um composto de degradação enzimática específica para mais de 95% de todos os isolados de *E.coli*. Esse método, identificado como "substrato cromogênico", é aprovado em muitos países e está incluso em procedimentos padronizados reconhecidos para examinar águas de consumo (Edberg et al., 2000).

Para a Resolução nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente de 18 de junho de 1986 (Brasil, 1986) que classifica os corpos d'água de acordo com sua destinação e uso, os limites permitidos para níveis de contaminação fecal são apresentados quantitativamente relacionados a essa classificação. Águas naturais em uso por banhistas e também em outras atividades recreativas apresentam organismos de indicação fecal e vários outros patógenos. Isto deve-se à prática de disposição de esgoto bruto, parcialmente tratado, efluentes industriais e ainda de despejos agrícolas em águas superficiais. Apesar dos relatos de incidentes com os freqüentadores de balneários e relevantes trabalhos científicos sobre doenças causadas por patógenos, faltam estudos epidemiológicos para avaliar o risco potencial em usar águas para essas atividades, uma vez que o gerenciamento ambiental baseia-se em legislações difíceis de serem adaptadas às evidências científicas (Fewtrell & Jones, 1992).

Em recente revisão (Resolução Nº 274 de 29 de novembro de 2000 citada em Brasil, 2001b), o Conselho Nacional do Meio Ambiente relata a necessidade de reavaliar os limites estabelecidos para a balneabilidade, incluindo outros indicadores específicos, além dos coliformes fecais já mencionados anteriormente, e recomendando o uso de um sistema de avaliação da qualidade ambiental das águas. Essas modificações revogam os artigos de nº26 a 34 da Resolução do CONAMA nº20 (Brasil, 1986). Uma modificação importante é a possibilidade de utilizar mais de um indicador microbiológico, objetivando um critério mais restritivo de avaliação. Além dos coliformes fecais (ou termotolerantes), também são incluídos *Escherichia coli* e enterococos; os primeiros são encontrados em esgotos, efluentes, águas naturais, solos e abundantes em fezes humanas e animais enquanto que os enterococos constitui um grupo contendo a maioria das espécies de origem fecal humana e se caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, tais como: presença de 6,5% de cloreto de sódio, pH 9,6 e temperaturas de 10° e 45°C, sendo considerados mais apropriados indicadores de águas recreativas do que os coliformes fecais (Edberg et al., 1997). Devido a sua alta resistência a sais, os enterococos são bons indicadores para águas marinhas e estuarinas (Edberg et al., 2000). A nova resolução, acima citada, também contempla condições sanitárias e ambientais dos balneários, considerando as águas impróprias quando da presença de substâncias sólidas ou líquidas que ofereçam riscos à saúde humana, houver florações de algas ou outros organismos, sem antes se certificar das conseqüências para o homem, ou existir incidência elevada, na região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica. Por causa da eutrofização de águas superficiais, a abundância e a concentração de cianobactérias tem aumentado na última década, sendo presentes e dominantes em muitos lagos durante os meses de verão, produzindo florações e espuma na superfície da água (Szewzyk et al., 2000; Karner et al., 2001; Deberdt, 2001). O contato direto com essas florações tem sido associado à vários sintomas agudos como gastrites, dermatites e reações alérgicas (World Health Organization, 1999; AWWA Research Division, 1999; Szewzyk et al., 2000).

Com referência às águas utilizadas para consumo humano, provenientes de mananciais de abastecimento após o tratamento adequado, os atuais indicadores -coliformes totais e fecais- não asseguram que esteja livre de outros microrganismos potencialmente patogênicos como vírus e protozoários. Os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* têm sido considerados mundialmente importantes patógenos de veiculação hídrica, causadores de inúmeros casos de gastroenterites e diarréias. *Giardia lamblia* infecta o homem e uma variedade grande de animais, enquanto *Cryptosporidium parvum* foi reconhecido como patógeno humano mais recentemente, causando diarréia aguda em seres humanos imunocompetentes ou enfermidade fatal em indivíduos imunocomprometidos, como os portadores de HIV. Ambos são parasitas obrigatórios e só se multiplicam dentro de seu respectivo hospedeiro, no entanto *C. parvum* não é espécie-específico e pode ser facilmente transmitido de um mamífero para outro ou de um animal para o homem. Os oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* são excretados com fezes contaminadas e podem sobreviver sob as mais variadas condições do



meio: em esgotos (Farias, 1999), em corpos d'água (Farias, 1999; Gale, 2001; Franco et al., 2001), além de resistirem às atuais práticas utilizadas para o tratamento de água (Szewzyk et al., 2000; Gale, 2001), resultando em subestimar a sua remoção pelo tratamento e o risco de infecção para a população.

A preocupação com esses protozoários fez com que em recente revisão de legislação para água de consumo humano (Portaria 1469/00 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária em Brasil, 2001c) a pesquisa desses organismos fosse uma recomendação, juntamente com *Giardia* e enterovírus. Para garantir a qualidade microbiológica da água e assegurar a adequada eficiência de remoção de enterovírus, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, a legislação recomenda níveis mínimos bem definidos de turbidez para o efluente filtrado.

Entre as substâncias químicas que representam risco à saúde, a nova Portaria apresenta as cianotoxinas como um importante parâmetro de qualidade, já que as cianobactérias estão cada vez mais presentes na superfície de corpos d'água. Elas são conhecidas por produzir uma grande variedade de toxinas, incluindo neurotoxinas, hepatotoxinas e irritantes de pele. Em ambientes aquáticos as toxinas normalmente permanecem contidas nas células das cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre com a morte natural das células, estresse celular, uso de algicidas ou cloração.

O tratamento convencional das águas, incluindo coagulação, clarificação e filtração, é efetivo para remover células de cianobactérias, porém não removem ou destroem as cianotoxinas dissolvidas, especialmente de águas com alto teor de matéria orgânica (AWWA Research Division, 1999; World Health Organization, 1999; Karner et al., 2001). Tem sido recomendado o uso de carvão ativado e a ozonização, como métodos eficientes e de maior proteção contra as cianotoxinas em água tratada. Muitas cianotoxinas acumulam-se nos órgãos humanos, causando câncer, e também podem estar em animais aquáticos marinhos e de água doce que serão consumidos contaminados. Foi registrado um caso inédito atribuído às cianotoxinas no Brasil, ocorrido no reservatório de Itaparica, causando uma severa e epidêmica gastroenterite em 2000 pessoas, implicando em 88 mortes, a maior parte crianças.

O fato foi comprovado por dados laboratoriais e epidemiológicos conclusivos de que o reservatório apresentava toxinas produzidas por florações de algas dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* presentes na água não tratada (World Health Organization, 1999). Dentre os poucos relatos de efeito tóxico causado no homem, está mais um caso ocorrido no Brasil; aconteceu no Centro de Hemodiálise de Caruaru em Pernambuco, onde 117 pacientes foram expostos a microcistinas em água utilizada para diálise, resultando em pelo menos 49 mortes. Essa ocorrência foi devido a tratamento deficiente da água de distribuição da cidade e mau funcionamento e não eficiente manutenção do sistema de tratamento de água de diálise (World Health Organization, 1999; Szewzyku et al., 2000; Karner et al., 2001). Os padrões de qualidade e segurança para funcionamento das Unidades de Diálise e de Transplante Renal no Brasil são definidos pela Portaria 2.042 de 11 de outubro de 1996, do Ministério da Saúde (Brasil, 1996).

Hoje no Brasil, principalmente em grandes cidades, a utilização de águas minerais para uso domiciliar e mesmo para abastecer bebedouros em empresas, é uma prática muito comum. Isso deve-se, em parte, a alterações de sabor e odor que podem ser verificadas em águas disponíveis para abastecimento público, causadas muitas vezes pela presença de algas e actinomicetos presentes em reservatórios utilizados como fonte de abastecimento. Mesmo não causando risco para a saúde, se presentes em grandes concentrações, podem deixar dissolvidas na água substâncias que alteram suas características físicas, afetando sua aceitabilidade para o paladar humano. Assim, a procura por água de melhor qualidade para fins de potabilidade tem criado novos hábitos na população, que tem substituído muito freqüentemente a água disponível proveniente de sistemas de abastecimento por outras fontes alternativas, águas naturais de nascentes, fontes ou poços artesianos. A qualidade e controle de distribuição de águas minerais para uso como consumo humano são indicados na Resolução-RDC Nº 54, de 15 de junho de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, citada em Brasil (2000).

As informações contidas nos estudos relatados aqui permitem acentuar a necessidade de alterações mais ágeis e constantes na legislação, sobre os padrões microbiológicos e de toxinas liberadas por organismos aquáticos, uma vez que existe um distanciamento grande entre o avanço da pesquisa e a legislação pertinente.

## Referências

AWWA Research Division. Microbiological Contaminants Research Committee. Emerging pathogens-bacteria. **Journal of the AWWA**, v.91, n.9, p.101-109, 1999a.

AWWA Research Division. Microbiological Contaminants Research Committee. Emerging pathogens-viruses, protozoa, and algal toxins. **Journal of the AWWA**, v.91, n.9, p.110-119, 1999b.

BERALDI, S. R.; MARQUES, E.G.L.; DIAS M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isoospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.97-103, 1999.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. São Paulo, CETESB/ASCETESB, 1986. 640p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Resolve estabelecer a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.11.356, jul. 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.042, de 11 de outubro de 1996. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos Serviços de Terapia Renal Substitutiva e as normas para cadastramento desses estabelecimentos junto ao Sistema Único de Saúde e revoga a Portaria SAS n. 38 de março de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20.792-20.797, 14 out. 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 54, de 15 de junho de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural. **Diário Oficial da União**, Brasília, 37, 19 jun. 2000.

BRASIL. Lei 9.433 de 08 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Disponível. 2001a.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Revoga os arts nº 26 a 34 da Resolução do CONAMA nº 20 de junho de 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23, 8 jan. Seção1. 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Portaria nº 1469/2000, de 29 de dezembro de 2000: Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, (1-E): 19, jan. Seção 1. 2001c.

CRAUN, G.F. & CALDERON, R.L. Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies. **Journal of the AWWA**, v.93, n.8, p. 62-75, 2001.

DEBERDT, G.L., AZEVEDO, S.M.O.; CALIJURI, M.C. Estudo das cianobactérias tóxicas em um Reservatório tropical hipereutrófico (Salto Grande - Americana-SP). **I Seminário Latino-Americano sobre Cianobactérias Tóxicas: Qualidade da Água e Saúde Pública**, Rio de Janeiro, RJ, dezembro, 2001.

EDBERG, S.C.; LeCLERC, H.; ROBERTSON, J. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites. **Critical Reviews in Microbiology**, v.23, n.2, p. 179-206, 1997.

EDBERG, S.C.; RICE E.W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for health protection. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 106S-116S, 2000.

FARIAS, E.W.C. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo. São Paulo, 1999. 99p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

FEWTRELL, L.; JONES, F. Microbiological aspects and possible health risks of recreational water. In: KAY, D. (Ed.). **Recreational water quality management**. Volume 1 – coastal waters. London: Ellis Horwood, 71-87, 1992.

FRANCO, R.M. ; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cystis in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil (brief communication). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.43, n.2, p. 107-109, 2001.

FUJIOKA, S.; YONEYAMA, B.S. Assessing the vulnerability of groundwater sources to fecal contamination. **Journal of the AWWA**, v.93, n.8, p. 62-71, 2001.

GALE, P. A review - Developments in microbiological risk assessment for drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p. 191-205, 2001.

KARNER, D. A.; STANDRIDGE, J.H.; HARRINGTON, G. W.; BARNUM, R. P. Microcystin algal toxins in source and finished drinking water. **Journal of the AWWA**, v.93, n.8, p. 72-81, 2001.

LEAL, L. N. Não há esgoto em 47,8% dos municípios. **O Estado de São Paulo**. São Paulo, 28 mar.2002.

PROJETO PIRACENA. **Cartilha ambiental Esso-Piracena**. Piracicaba, São Paulo. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/piracena/cartilha.pdf>> Acesso em maio 2007.

RADAR: O Brasil sem saneamento. **Veja**, São Paulo, (1745): 30, 03 abr. 2002.

SIGRH – Sistema de Informações Gerenciais para Recursos Hídricos do Estado de São Paulo. **“Relatório Zero”do CBH-PCJ, 2000**. Disponível em < <http://www.sigrh.sp.gov.br> > Acesso em: 03 abr. 2007.

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER, K. H. Microbiological safety of drinking water. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p. 81-127, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CHORUS, I.; BARTRAM, J. eds. **Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and anagement**. London, E & FN Spon, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Drinking Water Quality**. 2.ed., addendum to Vol.2. Health Criteria and Other Supporting Information. Geneva, Switzerland, 1998.



**SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**



**GOVERNO DO ESTADO DE  
SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ