

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE ALFACE POR RIZOBACTÉRIAS⁽¹⁾

S. S. FREITAS⁽²⁾, A. M. T. MELO⁽²⁾ & V. P. DONZELI⁽³⁾

RESUMO

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) podem ser uma alternativa para o aumento da produtividade de várias espécies vegetais, inclusive alface. Conduziram-se quatro experimentos com isolados de rizobactérias de diversas origens para verificar sua capacidade de promoção de crescimento de plantas de alface. Ao todo, testaram-se 77 isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente, 23 de *Bacillus* e 11 de outras bactérias rizosféricas em areia esterilizada, em solo esterilizado, em substrato formado por uma mistura de solo e esterco (1:1, em volume), de forma semelhante à usada pelos produtores, e em areia com a solução nutritiva recomendada para cultivos hidropônicos, em duas concentrações. Foi marcante o benefício exercido pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* em contraposição às dos outros gêneros, revelando algum favorecimento dessas bactérias na rizosfera de alface, de forma a promover melhor crescimento das plantas. Houve diferenças no comportamento dos isolados conforme a fertilidade do substrato.

Termos de indexação: RPCPs, *Pseudomonas*, *Bacillus*, substrato.

SUMMARY: GROWTH ENHANCEMENT OF LETTUCE BY RHIZOBACTERIA

Rhizobacteria (PGPR) as plant growth boosters can be an option for increased productivity in several crops, including lettuce. Four assays with rhizobacteria isolates from different origins were carried out to verify their potential for growth enhancement in lettuce. Seventy seven fluorescent pseudomonads, 23 Bacillus, and 11 other rhizospheric bacteria isolates were tested in sterilized sand, in sterilized soil, and in a substrate mixture of soil and cattle manure (1:1, in volume), similar to the mixture used by producers, and in sand with a hydroponic solution, in two concentrations. The beneficial effect of fluorescent pseudomonades was remarkably superior, compared to the other genera. The lettuce rhizosphere possibly favors fluorescent pseudomonads, causing an improved plant growth. According to the substrate fertility, there were differences in the behavior of the isolates.

Index terms: PGPR, *Pseudomonas*, *Bacillus*, substrate.

⁽¹⁾ Trabalho apresentado no XXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Londrina (PR). Recebido para publicação em junho de 2001 e aprovado em julho de 2002.

⁽²⁾ Pesquisadora Científica, Instituto Agronômico – IAC. Caixa Postal 28, CEP 13001-970 Campinas (SP). E-mail: sfreitas@iac.br

⁽³⁾ Doutoranda, Universidade de Campinas – UNICAMP. Caixa Postal 6109, CEP 13084-971 Campinas (SP). Bolsista da FAPESP.

INTRODUÇÃO

Já é bem conhecido o efeito que algumas bactérias podem exercer sobre o crescimento de plantas, tendo sido criada há muito a expressão “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)” (Kloepper & Schroth, 1978). A promoção de crescimento, que pode ser detectada de várias formas, como o aumento em altura ou matéria seca ou, ainda, em produtividade, é desejável sob a maioria dos pontos de vista. Inúmeros trabalhos já foram publicados sobre o assunto, como os de Freitas (1989), Silveira et al. (1995), Dashti et al. (1998), Nandakumar et al. (2001), além de outros, para diferentes espécies vegetais.

Ainda assim, os modos pelos quais as rizobactérias exercem seu benefício não são plenamente conhecidos. Como essa denominação de RPCPs engloba grande número de espécies e mesmo gêneros bacterianos, é provável que o desconhecimento de seu modo de ação se deva justamente a essa ampla diversidade de microrganismos envolvidos. Entre os modos de ação mais aventados para as RPCPs estão a produção de reguladores de crescimento de plantas, o aumento do acesso a nutrientes – de várias formas – o controle de doenças e a fixação associativa de nitrogênio (Dashti et al., 1998). Outra maneira de promover o crescimento seria pela produção de hormônios, que podem atuar diretamente no alongamento da raiz, conforme já observado para alface (Barazani & Friedman, 2000).

Segundo Kloepper (1993), pertencem ao grupo fluorescente de *Pseudomonas* sp. muitos isolados de RPCPs. Em alguns casos, a eficiência de *Pseudomonas fluorescens* quanto à promoção do crescimento pode ser muito alta: Nandakumar et al. (2001) relataram ter conseguido, pelo uso de *P. fluorescens*, indução de resistência sistêmica à doença causada por *Rhizoctonia solani* em arroz. A bactéria diminuiu a incidência da doença, promoveu o crescimento das plantas e aumentou a produção de massa de matéria seca e de grãos, tanto em experimentos em casa de vegetação quanto no campo. A eficiência da bactéria em reduzir a doença foi comparável à do fungicida carbendazim, utilizado no controle da doença. Isolados de *P. fluorescens* também já foram utilizados no controle de *Meloidogyne incognita*, nematóide causador de galhas em tomate, em combinação com uma série de adubos orgânicos e minerais (Siddiqui et al., 2001). Os autores observaram que determinado isolado, em combinação com a adição de esterco, foi a melhor maneira de aumentar o crescimento da planta e diminuir a formação de galhas e a própria multiplicação do nematóide.

Há poucos relatos sobre promoção de crescimento por RPCPs em alface. De qualquer maneira, parece interessante que a promoção de crescimento se exerça sobre a produção de matéria seca da parte aérea, justamente a que é consumida nessa cultura.

É importante notar que *Rhizobium leguminosarum*, uma espécie bacteriana conhecida como fixadora simbiótica de nitrogênio em leguminosas, já tenha sido indicada como promotora de crescimento de alface, pela produção de reguladores de crescimento (Antoun et al., 1998). Os mesmos autores citaram trabalhos do próprio grupo em que *R. leguminosarum* bv. *phaseolii* promoveu aumento de matéria seca e do acúmulo de fósforo em milho e alface.

Nem sempre, porém, rizobactérias promovem o crescimento de plantas, havendo mesmo diversos relatos de inconsistência nos resultados, em que um isolado ora é benéfico, ora não tem ação sobre o crescimento vegetal. Um dos motivos pelos quais ocorreria essa inconsistência pode ser a dificuldade de a bactéria colonizar a rizosfera, por alterações nas condições do ambiente (Misaghi, 1990). Seong et al. (1991) mencionaram que dois isolados fluorescentes, um de *P. fluorescens* e um de *P. aeruginosa*, já reconhecidos como promotores de crescimento de várias espécies vegetais, têm seu efeito expresso com mais intensidade quando a planta é submetida a condições subótimas de crescimento. Entre as condições ambientais que influenciam a atividade das bactérias está a presença de nutrientes no solo: Siddiqui et al. (2001) obtiveram diferentes respostas de *Pseudomonas fluorescens* associadas à presença de adubos minerais e orgânicos.

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de isolados de rizobactérias em promover o crescimento de plantas de alface, em diferentes substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Nos quadros 1 e 2, estão relacionados todos os isolados bacterianos utilizados nos experimentos aqui relatados e suas origens.

A obtenção de parte desses isolados foi descrita por Freitas (1994). Basicamente, raízes de plantas aparentemente sadias e vigorosas, crescendo no campo, foram agitadas em frascos de Erlenmeyer com solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 mol L⁻¹. A suspensão de solo assim obtida foi dispersa com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri com meio B de King et al. (1954). As colônias que apresentaram fluorescência sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta foram isoladas como pertencentes ao grupo fluorescente de *Pseudomonas* sp. (Stanier et al., 1966). As colônias que não apresentaram fluorescência foram isoladas sob a denominação de “outras bactérias rizosféricas”. Aliquotas da mesma suspensão foram submetidas à temperatura de 80 °C, em banho-maria, durante 20 minutos, e, a

Quadro 1. Origem dos isolados de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas*

| Isolado | Origem | Isolado | Origem | |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Ps 21A ⁽¹⁾ | Rizosfera de algodoeiro | Ps 53A ⁽¹⁾ | Rizosfera de tomateiro | |
| Ps 21B ⁽¹⁾ | | Ps 53B ⁽¹⁾ | | |
| Ps 21C ⁽¹⁾ | | Ps 53C ⁽¹⁾ | | |
| Ps 22A ⁽¹⁾ | | Ps 54A ⁽¹⁾ | | |
| Ps 22B ⁽¹⁾ | | Ps 54B ⁽¹⁾ | | |
| Ps 23A ⁽¹⁾ | | Ps 54C ⁽¹⁾ | | |
| Ps 23B ⁽¹⁾ | | Ps 55 | | |
| Ps 23C ⁽¹⁾ | | Ps 60A | | Rizosfera de citros |
| Ps 31A ⁽¹⁾ | Rizosfera de milho | Ps 60B | (Tangerina Cleópatra) | |
| Ps 31B ⁽¹⁾ | | Ps 62 | | |
| Ps 31C ⁽¹⁾ | | Ps 63 | | |
| Ps 31D ⁽¹⁾ | | Ps 65A | | |
| Ps 32 ⁽¹⁾ | | Ps 66B | | |
| Ps 33 ⁽¹⁾ | | Ps 70 | | Rizosfera de citros |
| Ps 34C ⁽¹⁾ | Ps 71 | (limão cravo) | | |
| Ps 41A ⁽¹⁾ | Rizosfera de soja | Ps 72 | | |
| Ps 41B ⁽¹⁾ | | Ps 73 | | |
| Ps 41C ⁽¹⁾ | | Ps 74 | | |
| Ps 42A ⁽¹⁾ | | Ps 76 | | |
| Ps 42B ⁽¹⁾ | | Ps 77 | | |
| Ps 42C ⁽¹⁾ | | Ps 80 | | Rizosfera de couve |
| Ps 43A ⁽¹⁾ | | Ps 85 | | Rizosfera de alface |
| Ps 43B ⁽¹⁾ | | Ps 88 | | Rizosfera de repolho |
| Ps 43C ⁽¹⁾ | Ps 91 | Rizosfera de pimentão | | |
| Ps 44A ⁽¹⁾ | Ps 92 | | | |
| Ps 44B ⁽¹⁾ | Ps 201A | Solo não solarizado | | |
| Ps 45A | Ps 211A | | | |
| Ps 45B | Ps 221 | Solo solarizado | | |
| Ps 45C | Ps 222 | | | |
| Ps 46 | Ps 223 | | | |
| Ps 47A | Ps 802 | Rizosfera de cebola | | |
| Ps 47B | Ps 805 | | | |
| Ps 47C | G20 18 (<i>P. fluorescens</i>) | J. W. Kloepper, Canadá | | |
| Ps 47D | W4F58 (<i>P. fluorescens</i>) | D. C. Gross | | |
| Ps 51A ⁽¹⁾ | Rizosfera de tomateiro | W4F111 (<i>P. fluorescens</i>) | (Washington State Univ.) | |
| Ps 51B ⁽¹⁾ | | W4P5 (<i>P. putida</i>) | | |
| Ps 52A ⁽¹⁾ | | W4P144 (<i>P. putida</i>) | | |
| Ps 52B ⁽¹⁾ | | 136RN ⁽²⁾ | | Rizosfera de milho |

⁽¹⁾Isolados obtidos por Freitas (1994). ⁽²⁾Isolado obtido por Brandão (1989).

seguir, dispersas em placas de Petri que continham meio BDA (batata-dextrose-ágar). As colônias que cresceram após dois dias a 28 °C foram isoladas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (Bettliol, 1995). Para a obtenção dos isolados bacterianos do solo, o procedimento foi semelhante, com a diferença de que a suspensão a partir da qual se procedeu ao isolamento foi obtida a partir do solo e não de raízes de plantas.

Não foi feita tentativa de identificação das bactérias agrupadas sob a designação de outras bactérias rizosféricas, uma vez que o experimento teve como finalidade a obtenção de isolados bacterianos benéficos, não importando, nesse momento, sua identificação correta. Para os três grupos bacterianos considerados, procurou-se trabalhar com isolados purificados, riscando-os em placas de Petri com os meios de cultura já citados para confirmação da ocorrência de colônias macroscopicamente semelhantes e observando-os ao microscópio óptico após coloração de Gram.

Experimento em areia esterilizada

Trinta isolados bacterianos foram inoculados em plântulas de alface, cultivar Brisa, com cerca de 5 cm de altura, cultivadas em vasos com 0,5 kg de areia esterilizada mantidos em casa de vegetação, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Esse delineamento foi usado também para os outros experimentos descritos neste trabalho. Utilizaram-se 10 isolados de *Pseudomonas* spp., treze de *Bacillus* spp. e sete de outras bactérias rizosféricas, com cinco repetições de cada tratamento. A inoculação foi feita com 8 mL de meio B de King et al. (1954), no qual as bactérias crescem há 72 h; a testemunha recebeu 8 mL de meio de cultura esterilizado. Semanalmente, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva com vistas em fornecer a cada uma as seguintes quantidades de nutrientes, em mg: N, 8,68; P, 0,80; K, 5,80; Ca, 6,93; Mg, 0,91 e S, 0,924. Adicionou-se também uma solução de micronutrientes, com exceção do ferro, para fornecer a cada planta as

Quadro 2. Origem dos isolados de *Bacillus* spp. e de outras bactérias rizosféricas

| Isolados de <i>Bacillus</i> spp. | Origem | Isolados de outras bactérias rizosféricas | Origem |
|----------------------------------|--|---|-----------------------|
| Bc 41A | Rizosfera de soja | Rz 41 | Rizosfera de soja |
| Bc 41B | | Rz 60 | Rizosfera de citros |
| Bc 42A | | Rz 61 | (Tangerina Cleópatra) |
| Bc 43A | | Rz 70 | Rizosfera de citros |
| Bc 44 | | Rz 71 | (limão cravo) |
| Bc 45A | | Rz 75 | |
| Bc 55 | Rizosfera de tomateiro | Rz 76B | |
| Bc 60 | Rizosfera de citros (Tangerina Cleópatra) | Rz 80 | Rizosfera de couve |
| Bc 61 | | Rz 81 | |
| Bc 62 | | Rz 88 | Rizosfera de repolho |
| Bc 70 | Rizosfera de citros (limão cravo) | Rz 90 | Rizosfera de pimentão |
| Bc 71 | | | |
| Bc 72 | | | |
| Bc 80 | Rizosfera de couve | | |
| Bc 81 | | | |
| Bc 85A | Rizosfera de alface | | |
| Bc 85B | | | |
| Bc 88 | Rizosfera de repolho | | |
| Bc 90 | Rizosfera de pimentão | | |
| Bc 91 | | | |
| Bc 92 | | | |
| Bc 801 | Rizosfera de cebola | | |
| Bc 802 | | | |

seguintes quantidades de nutrientes, em mg: B, 0,01; Cl, 1,81; Cu, 0,002; Mn, 0,03; Mo, 0,04 e Zn, 0,008. Vinte e nove dias depois da emergência, a parte aérea das plantas foi colhida e sua matéria seca, determinada.

Experimento em solo esterilizado

Desenvolveu-se um experimento com alface cultivar Brisa mantida em vasos com 0,5 kg de solo esterilizado, com cinco repetições de cada tratamento, em casa de vegetação. A análise do solo, um Latossolo Amarelo, mostrou os seguintes valores: P (mg dm⁻³), 20; em mmol_c dm⁻³: K, 3,9; Ca, 42; Mg, 36; H + Al, 16; soma de bases, 82; T, 98; matéria orgânica, em g dm⁻³: 39; pH em CaCl₂, 6,3; V, em %: 84.

As plântulas, quando tinham cerca de 5 cm de altura, receberam inóculo de 14 isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, 10 de *Bacillus* spp. e seis de outras bactérias rizosféricas, separadamente. O inóculo consistiu de 8 mL de meio de cultura B de King et al. (1954), no qual as bactérias crescem há 72 h. O tratamento-testemunha recebeu 8 mL de meio esterilizado.

Semanalmente, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva para fornecer a cada uma as seguintes quantidades de nutrientes, em mg: N, 8,68; P, 0,80; K, 5,80; Ca, 6,93; Mg, 0,91 e S, 0,924. Adicionou-se a mesma solução de micronutrientes já citada para o experimento em areia, também com exclusão do ferro. Aos 50 dias, colheu-se a parte aérea das plantas, para pesagem de matéria seca.

Experimento em substrato com esterco

Numa tentativa de obter dados de seleção de isolados em condições de solo semelhantes às que

ocorrem nos cultivos agrícolas, desenvolveu-se um experimento em que plantas de alface do cultivar Brasil 221 foram mantidas em vasos com 0,5 kg de uma mistura de solo - o mesmo utilizado no experimento anterior - e esterco, em proporções iguais em volume. A análise da mistura apresentou os seguintes resultados: matéria orgânica, em g dm⁻³: 63; em mg dm⁻³: P (resina), 291; B, 1,15; Cu, 5,2; Fe, 36; Mn, 46,9; Zn, 24,3; em mmol_c dm⁻³: K, 79,0; Ca, 97; Mg, 51; H + Al, 10, soma de bases, 227,0; CTC, 236,7; pH, em CaCl₂, 7,6; saturação por bases, 96 %. A dez quilogramas dessa mistura adicionaram-se 100 g de adubo mineral com a fórmula 4-14-8, de maneira semelhante à adotada pelos produtores.

Não foi usado o cultivar Brisa, que havia sido retirado do mercado pela empresa produtora. Optou-se, então, pela utilização do cultivar Brasil 221, de folha lisa, do banco de germoplasma do IAC. Ainda que 'Brisa' tivesse folha crespa, diferentemente do 'Brasil 221', de folha lisa, o cuidado maior para essa substituição foi o de escolher outro cultivar de verão, considerando ser essa característica mais importante do que o tipo de folha, em relação ao objetivo do trabalho.

Neste experimento, utilizaram-se apenas bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Intencionalmente, repetiu-se o tratamento com treze dos catorze isolados do experimento anterior. Seis dias após a semeadura, quando as plântulas tinham cerca de 1 cm de altura, inocularam-se as bactérias, veiculadas em 8 mL de meio B de King, no qual crescem há 72 h. A testemunha sem inoculação recebeu o mesmo volume de meio de cultura esterilizado. Duas semanas depois, procedeu-se ao

desbaste para deixar uma planta por vaso. Procedeu-se à reinoculação uma semana depois do desbaste, da forma supradescrita. Quarenta e um dias após a semeadura, colheu-se apenas a parte aérea, que foi seca em estufa até massa constante.

Experimento em solução nutritiva

Existe a possibilidade de que rizobactérias possam exercer ou não benefício, em função do nível de fertilidade do substrato (Siddiqui et al., 2001). Para isso, desenvolveu-se um experimento com dois níveis de nutrição das plantas.

Para a definição dos isolados a serem inoculados, decidiu-se pelos que promoveram significativamente o crescimento das plantas no experimento anterior. Incluíram-se também os três que conferiram menor massa de matéria seca, ainda que não diferindo da testemunha, e alguns isolados ainda não testados, obtidos a partir de amostras de solo solarizadas e não solarizadas, providas de uma área com histórico de cultivo de alface. As plantas de alface eram do cultivar Brasil 221.

Mantiveram-se as plantas em areia lavada, em vasos com capacidade de 0,5 kg, e irrigadas somente com solução nutritiva. Incluíram-se dois níveis nutricionais, mantendo-se os vasos com a solução nutritiva utilizada em cultivos hidropônicos de alface (Furlani & Furlani, 1988). Tentativamente, usou-se a solução com condutividade de 2 mS, aqui chamada de solução diluída, e, na outra metade dos vasos, a solução com condutividade de 4 mS, aqui chamada de solução completa. As plantas foram irrigadas em dias alternados, recebendo a cada vez 50 mL de solução com a seguinte concentração de nutrientes, em mg L⁻¹: N, 44,8; P, 12,6; K, 38,7; Ca, 36,6; Mg, 16,2; S, 21,2. Essa solução era a diluída; a concentrada tinha o dobro da concentração de nutrientes. A irrigação incluiu a mesma solução de micronutrientes indicada para o experimento com areia, também com exclusão de ferro.

Dezenove dias após a semeadura, inocularam-se as bactérias, em 8 mL de meio B de King, no qual crescem há 72 h. As testemunhas receberam meio de cultura esterilizado. Um mês após a inoculação, as plantas tiveram sua parte aérea colhida para determinação da matéria seca.

Análises estatísticas

A análise de variância foi pelo teste F e as comparações de médias, pelo teste unilateral de Dunnett, a 5 e 1 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento em areia esterilizada

Dos 10 isolados de *Pseudomonas*spp. inoculados, oito proporcionaram aumento de matéria seca em

relação à testemunha sem inoculação (Quadro 3). Quanto aos dois restantes, um não teve qualquer efeito e o outro ocasionou a morte de todas as plantas. Os isolados pertencentes aos outros grupos bacterianos não tiveram efeito sobre a matéria seca das plantas.

Não se observou relação quanto à origem do isolado e sua capacidade de afetar o crescimento vegetal. Isso torna-se mais evidente quando se considera que o isolado Ps 91 e o Ps 92 têm a mesma origem - rizosfera de pimentão (Quadro 1) - e tiveram comportamento bem diferente quanto ao seu efeito sobre as plantas em que foram inoculados: o primeiro revelou-se patogênico e o segundo aumentou o crescimento em quatro vezes em relação à testemunha.

Nos resultados, vale destacar a alta ocorrência de RPCPs entre os isolados do gênero *Pseudomonas*. Isso vem corroborar as observações feitas por Kloepper (1993), que verificou a presença de grande número de promotores do crescimento vegetal entre as bactérias do grupo fluorescente desse gênero. Há muito já se sabe que *Pseudomonas*spp. são favorecidas na rizosfera, diferentemente do que ocorre com *Bacillus* spp. (Dommergues & Mangenot, 1970). Para evitar alguma limitação à colonização por *Bacillus* spp., todos os isolados utilizados neste experimento foram provenientes da rizosfera de diversas espécies vegetais, na suposição de que microrganismos rizosféricos encontram menor dificuldade em sobreviver nesse ambiente. No entanto, sabe-se que a própria definição física da rizosfera é difícil, já que em alguns milímetros pode-se passar de uma região rizosférica para outra em que as raízes não exerçam influência. Neste experimento, tanto os isolados de *Bacillus* quanto os de outras bactérias rizosféricas não mostraram habilidade específica em promover o crescimento das plantas (Quadro 3).

Outro ponto a considerar é o substrato em que as plantas foram cultivadas, a areia. Deve ter ocorrido estresse durante todo o tempo, já que as quantidades de nutrientes fornecidas foram baixas, em comparação com o que é normalmente oferecido pelos agricultores e simulado no experimento em solo com solução nutritiva. A presença de nutrientes - ou a sua ausência - deve ser fator preponderante a definir a qualidade e a quantidade de exsudatos radiculares liberados pela alface, afetando a sobrevivência e a atividade das rizobactérias, na mesma linha de raciocínio seguida por Seong et al. (1991). A utilização da areia esterilizada pode ser empregada na seleção de RPCPs, já que se conseguiu observar efeito dos isolados, podendo constituir-se numa forma ágil de realizar a experimentação, mas há que se considerar que o ambiente pode influir bastante no comportamento das bactérias.

Experimento em solo esterilizado

Novamente, chama a atenção a porcentagem de ocorrência de promotores de crescimento entre os

Quadro 3. Matéria seca, em gramas, da parte aérea de plantas de alface tratadas com inóculos de diferentes bactérias, mantidas por 36 dias em casa de vegetação em vasos com areia esterilizada

| Tratamento ⁽¹⁾ | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca |
|---------------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | g | | g | | g |
| Testemunha | 0,10 | | | | |
| Bc 41A | 0,10 | Ps 45A | 0,42** | Rz 41 | 0,10 |
| Bc 41B | 0,11 | Ps 45B | 0,41** | Rz 60 | 0,09 |
| Bc 55 | 0,12 | Ps 55 | 0,37** | Rz 70 | 0,08 |
| Bc 60 | 0,12 | Ps 60A | 0,43** | Rz 80 | 0,12 |
| Bc 70 | 0,14 | Ps 70 | 0,47** | Rz 81 | 0,12 |
| Bc 80 | 0,08 | Ps 80 | 0,13 | Rz 88 | 0,11 |
| Bc 81 | 0,11 | Ps 85 | 0,39** | Rz 90 | 0,08 |
| Bc 85A | 0,17 | Ps 88 | 0,39** | | |
| Bc 85B | 0,16 | Ps 91 | -(2) | | |
| Bc 88 | 0,15 | Ps 92 | 0,42** | | |
| Bc 90 | 0,10 | | | | |
| Bc 91 | 0,11 | | | | |
| Bc 92 | 0,18 | | | | |

⁽¹⁾ Bc: *Bacillus* sp.; Ps: *Pseudomonas* sp.; Rz: outras bactérias rizosféricas. Médias seguidas por ** diferem da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett, a 1 %. ⁽²⁾ Todas as plantas morreram. Coeficiente de variação: 28,8 %.

isolados de *Pseudomonas* spp. em comparação com os de outros gêneros bacterianos: dos catorze inoculados, apenas dois não se incluíram entre as RPCPs (Quadro 4). Quanto aos *Bacilli*, dois isolados dos dez empregados tiveram esse mesmo efeito e apenas um entre os de outras bactérias rizosféricas. Ainda que o teste estatístico utilizado não tenha comparado os isolados entre si, pode-se observar que a média dos tratamentos com *Pseudomonas* spp. foi superior à dos com os outros gêneros (Quadro 4). O isolado Rz 88, incluído neste e no experimento anterior (Quadro 3), manteve seu desempenho de não promover o crescimento das plantas.

Ainda uma vez, não houve relação entre a origem dos isolados e a sua capacidade de promoção do crescimento. O único isolado das outras bactérias rizosféricas que favoreceu o crescimento das plantas - Rz 75 - foi obtido de limão-cravo (Quadro 2), bem como um dos benéficos do gênero *Bacillus*. Todavia, um dos dois únicos de *Pseudomonas* que não foram promotores de crescimento - Ps 72 - teve também essa origem. Os outros três isolados fluorescentes obtidos de limão-cravo tiveram efeito benéfico.

O isolado Ps 47D, originário de rizosfera de soja, não promoveu o crescimento, mas os outros três com essa mesma origem foram benéficos. Inversamente, o isolado Bc 43A foi o único do gênero *Bacillus* obtido em soja que promoveu o crescimento da parte aérea da alface.

Neste experimento, o substrato foi solo esterilizado. Ainda que o suprimento de nutrientes tenha sido feito da mesma forma que no experimento com areia, com as mesmas quantidades, é possível que a matéria orgânica já presente no solo tenha tido uma influência favorável sobre o crescimento das plantas. Os próprios microrganismos podem ter-se

favorecido disso, já que a matéria orgânica é fonte de nutrientes para a maioria dos quimiorganotróficos, categoria em que se enquadram as bactérias aqui consideradas. É possível que a matéria orgânica presente no solo tenha servido como fonte de nutrientes para os microrganismos inoculados até que as raízes da alface tenham começado a exsudar ativamente, de modo a sustentar a população inoculada.

Experimento em solo com esterco

Dos setenta isolados testados, vinte e oito - cerca de 40 % do total - promoveram o crescimento das plantas, não tendo havido nenhum que resultasse em prejuízo (Quadro 5). É uma alta porcentagem de bactérias benéficas, o que não se observou com bactérias de outros gêneros, da mesma forma que comentado por Kloepper (1993).

Quanto à origem dos isolados, nenhum dos obtidos em rizosfera de algodão e apenas um dos de rizosfera de milho promoveram o crescimento das plantas (Quadro 5). No entanto, dos dezenove isolados obtidos de soja, doze foram benéficos. O único isolado originado da própria cultura da alface e os dois de pimentão também foram promotores de crescimento.

O isolado Ps 47C não influenciou no crescimento das plantas, diferentemente do que ocorreu no experimento com solo esterilizado e sem esterco (Quadro 4). Naquele experimento, esse isolado havia sido promotor de crescimento, enquanto o Ps 47D, não benéfico no anterior, foi benéfico na presença do esterco adicionado. Os isolados Ps 62, Ps 63, Ps 65A, Ps 71, Ps 73 e Ps 805 foram promotores do crescimento, quando testados em solo esterilizado, mas não o foram em solo natural com adição de esterco bovino.

Quadro 4. Matéria seca da parte aérea de plantas de alface tratadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, *Bacillus* spp. e outras bactérias rizosféricas, mantidas por 50 dias em casa de vegetação em vasos com solo esterilizado

| Tratamento ⁽¹⁾ | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca |
|---------------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | g | | g | | g |
| Testemunha | 1,04 | | | | |
| Ps 47A | 1,77** | Bc 42A | 1,02 | Rz 61 | 1,05 |
| Ps 47B | 1,79** | Bc 43A | 1,65** | Rz 71 | 1,29 |
| Ps 47C | 1,99** | Bc 44 | 0,69 | Rz 75 | 1,50** |
| Ps 47D | 1,42 | Bc 45A | 1,03 | Rz 76B | 1,42 |
| Ps 62 | 1,81** | Bc 61 | 1,39 | Rz 81 | 1,31 |
| Ps 63 | 1,91** | Bc 62 | 1,06 | Rz 88 | 1,31 |
| Ps 65 ^A | 1,91** | Bc 71 | 1,07 | | |
| Ps 66B | 2,17** | Bc 72 | 1,54** | | |
| Ps 71 | 1,64** | Bc 801 | 1,07 | | |
| Ps 72 | 1,36 | Bc 802 | 1,31 | | |
| Ps 73 | 1,96** | | | | |
| Ps 76 | 2,30** | | | | |
| Ps 802 | 2,53** | | | | |
| Ps 805 | 2,02** | | | | |

⁽¹⁾ Bc: *Bacillus* sp.; Ps: *Pseudomonas* sp.; Rz: outras bactérias rizosféricas. Médias seguidas por ** diferem da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett, a 1 %. Coeficiente de variação: 25,3 %.

Quadro 5. Matéria seca da parte aérea de plantas de alface tratadas com inóculos de diferentes isolados do gênero *Pseudomonas*, mantidas por 47 dias em casa de vegetação em vasos com solo e esterco (1:1)

| Tratamento | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca | Tratamento | Matéria seca |
|--------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | g | | g | | g |
| Testemunha | 0,22 | Ps 43C | 0,40** | Ps 62 | 0,29 |
| Ps 21A | 0,27 | Ps 44A | 0,53** | Ps 63 | 0,27 |
| Ps 21B | 0,25 | Ps 44B | 0,45** | Ps 65A | 0,36 |
| Ps 21C | 0,26 | Ps 45A | 0,39* | Ps 66B | 0,45** |
| Ps 22A | 0,18 | Ps 45B | 0,27 | Ps 70 | 0,37 |
| Ps 22B | 0,19 | Ps 45C | 0,41* | Ps 71 | 0,35 |
| Ps 23A | 0,19 | Ps 46 | 0,41* | Ps 72 | 0,42* |
| Ps 23B | 0,22 | Ps 47A | 0,45** | Ps 73 | 0,29 |
| Ps 23C | 0,26 | Ps 47B | 0,47** | Ps 74 | 0,50** |
| Ps 31A | 0,29 | Ps 47C | 0,33 | Ps 76 | 0,44** |
| Ps 31B | 0,26 | Ps 47D | 0,50** | Ps 77 | 0,33 |
| Ps 31C | 0,20 | Ps 51A | 0,38 | Ps 80 | 0,54** |
| Ps 31D | 0,23 | Ps 51B | 0,42* | Ps 85 | 0,44** |
| Ps 32 | 0,25 | Ps 52A | 0,40* | Ps 91 | 0,44** |
| Ps 33 | 0,39* | Ps 52B | 0,40* | Ps 92 | 0,48** |
| Ps 34C | 0,37 | Ps 53A | 0,38 | Ps 805 | 0,32 |
| Ps 41A | 0,37 | Ps 53B | 0,52** | 136RN | 0,47** |
| Ps 41B | 0,41* | Ps 53C | 0,38 | G20-18 | 0,54** |
| Ps 41C | 0,32 | Ps 54A | 0,34 | W4F58 | 0,36 |
| Ps 42A | 0,38 | Ps 54B | 0,29 | W4F111 | 0,37 |
| Ps 42B | 0,38 | Ps 54C | 0,22 | W4F164 | 0,33 |
| Ps 42C | 0,33 | Ps 55 | 0,32 | W4P5 | 0,21 |
| Ps 43 ^A | 0,41* | Ps 60A | 0,25 | W4P144 | 0,51** |
| Ps 43B | 0,49** | Ps 60B | 0,26 | | |

Médias seguidas por * ou ** diferem da testemunha pelo teste unilateral de Dunnett, a 5 e 1 % respectivamente. Coeficiente de variação: 39,7 %.

Nesse caso, pode-se supor que, ainda que tais bactérias possuam potencial como RPCPs, essa habilidade só se tenha manifestado em ausência de competição com outros microrganismos, presentes no experimento com esterco. Seriam competidores fracos, de importância relativa para aplicação prática em grande escala. Inversamente, o isolado Ps 72, à

semelhança do Ps 47D, foi favorável ao crescimento vegetal no solo natural com adição de esterco, mas não no esterilizado. Essa habilidade pode ter sido expressa em função das melhores condições nutricionais para os próprios microrganismos propiciadas pela adição do esterco, conforme já discutido no item anterior, e não foi afetada pela

presença de outros microrganismos. De acordo com Seong et al. (1991), a própria capacidade de colonização das raízes pelas bactérias é alterada pelas diferentes condições ambientais.

Ainda que seja desejável a habilidade competitiva demonstrada, é óbvio que o que importa, mesmo, é a manutenção da atividade promotora de crescimento em condições variáveis de solo. A coerência no comportamento nas duas diferentes condições foi apresentada pelos isolados Ps 47A, Ps 47B, Ps 66B e Ps 76.

Experimento em solo com solução nutritiva

Nas plantas do tratamento-testemunha, isto é, nas que não receberam inóculo bacteriano, houve efeito da solução nutritiva, sendo maior a matéria seca das que receberam a solução completa, como era de se esperar (Quadro 6). Entre as plantas que receberam solução nutritiva diluída, quatro isolados (Ps 41B, Ps 85, Ps 91 e W4P144) atuaram como promotores de crescimento, ao passo que, na presença de solução completa, outros cinco isolados foram benéficos (Ps 44B, Ps 45A, Ps 45C, Ps 92 e G20-18). Cumpre notar que, para todos eles, esse benefício foi significativo também em relação à testemunha com adubação completa, indicando que o isolado foi eficiente mesmo em comparação à nutrição adequada. Esses isolados todos haviam

promovido o crescimento das plantas no experimento anterior, desenvolvido em solo misturado com esterco bovino. Ainda, o isolado Ps 52B, que havia sido benéfico no experimento com esterco, foi prejudicial na presença de solução nutritiva completa.

Como se observa, nenhum dos isolados benéficos na menor concentração de nutrientes repetiu seu desempenho na maior, tendo sido o inverso também verdadeiro. Esse aspecto traz de novo à baila o trabalho de Seong et al. (1991), em que as condições ambientais afetaram o desempenho de isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. O que ocorreu neste experimento sugere, novamente, que a capacidade de promoção de crescimento esteja ligada à fertilidade do substrato, de maneira semelhante à encontrada por Siddiqui et al. (2001), para o controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. Para essa conclusão contribui o fato de que diversos isolados (Ps 42A, Ps 43B, Ps 43C, Ps 44A, Ps 74, Ps 76, Ps 80, Ps 85, Ps 221, Ps 222 Ps 223 e 136RN), ainda que não tenham diferido da testemunha correspondente, resultaram em plantas com maior matéria seca na presença de solução nutritiva completa. Os isolados Ps 221, Ps 222 e Ps 223, que ainda não haviam sido testados, tiveram somente esse efeito, sem diferir da testemunha, mas os outros já se haviam revelado promotores de crescimento no experimento com esterco.

Quadro 6. Matéria seca da parte aérea de plantas de alface tratadas com diferentes isolados do gênero *Pseudomonas* e solução nutritiva, completa ou diluída, mantidas por 49 dias em casa de vegetação em vasos com areia

| Tratamento | Solução nutritiva | | Tratamento | Solução nutritiva | |
|------------|--------------------|----------------------|------------|--------------------|-----------------------|
| | Diluída | Completa | | Diluída | Completa |
| | g | | | g | |
| Testemunha | 0,46 | 0,73 ^{▲▲} | Ps 52B | 0,51 | 0,44 [*] |
| Ps 22A | 0,53 | 0,60 | Ps 53B | 0,64 | 0,66 |
| Ps 22B | 0,56 | 0,58 | Ps 53C | 0,67 | 0,73 |
| Ps 23A | 0,65 | 0,62 | Ps 66B | 0,59 | 0,73 |
| Ps 33 | 0,57 | 0,58 | Ps 72 | 0,60 | 0,74 |
| Ps 41B | 0,76 ^{**} | 0,81 | Ps 74 | 0,67 | 0,93 ^{▲▲} |
| Ps 42A | 0,62 | 0,83 [▲] | Ps 76 | 0,65 | 0,83 [▲] |
| Ps 43A | 0,65 | 0,76 | Ps 80 | 0,63 | 0,86 [▲] |
| Ps 43B | 0,62 | 0,89 ^{▲▲} | Ps 85 | 0,72 [*] | 0,96 ^{▲▲} |
| Ps 43C | 0,59 | 0,89 ^{▲▲} | Ps 91 | 0,70 [*] | 0,85 |
| Ps 44A | 0,70 | 0,89 [▲] | Ps 92 | 0,69 | 1,14 ^{***▲▲} |
| Ps 44B | 0,62 | 1,11 ^{**▲▲} | Ps 201A | 0,62 | 0,74 |
| Ps 45A | 0,69 | 1,05 ^{**▲▲} | Ps 211A | 0,63 | 0,73 |
| Ps 45C | 0,65 | 1,04 ^{**▲▲} | Ps 221 | 0,63 | 0,97 ^{▲▲} |
| Ps 46 | 0,70 | 0,76 | Ps 222 | 0,67 | 0,86 [▲] |
| Ps 47A | 0,54 | 0,61 | Ps 223 | 0,68 | 0,94 ^{▲▲} |
| Ps 47B | 0,59 | 0,55 | 136RN | 0,64 | 0,85 [▲] |
| Ps 47D | 0,70 | 0,64 | G20-18 | 0,67 | 1,06 ^{***▲▲} |
| Ps 51B | 0,64 | 0,58 | W4P144 | 0,81 ^{**} | 0,97 |
| Ps 52A | 0,66 | 0,65 | | | |

Médias seguidas por * ou ** diferem da testemunha correspondente, pelo teste unilateral de Dunnett, a 5 e 1 % respectivamente. Médias seguidas por ▲ ou ▲▲ diferem, dentro de cada tratamento de inoculação, pelo teste unilateral de Dunnett, a 5 e 1 % respectivamente. Coeficiente de variação: 22,0 %.

O desempenho variado dos isolados em relação ao substrato pode indicar uma ampla forma de modos de ação, o que é desejável em termos de aplicação prática. É melhor ter a possibilidade de manejo dos isolados, empregando-os em conjunto num eventual inoculante, do que contar apenas com organismos que atuam somente em condições restritas. Todavia, essa variação pode indicar também uma instabilidade do desempenho das bactérias, conforme já relatado por Hebbbar et al. (1992a,b). Acredita-se que essa instabilidade seja o principal obstáculo ao emprego de RPCPs em larga escala.

Com esse aspecto em vista, pode-se analisar o comportamento dos isolados bacterianos no conjunto dos experimentos aqui relatados. Alguns deles atuaram consistentemente sempre que foram empregados, outros não. Os isolados Ps 45A e Ps 92, por exemplo, foram promotores de crescimento sempre que inoculados: isso ocorreu no experimento com areia, no com solo e esterco e no com solução nutritiva, em que sua ação foi significativa na presença de solução completa. Já o isolado Ps 91 teve uma ação bastante inconsistente: no experimento com areia, chegou a matar todas as plantas que o receberam; no experimento com solo e esterco, foi promotor de crescimento e, no com solução nutritiva, foi benéfico somente na presença de solução diluída.

Ainda que essa instabilidade possa parecer indesejável, há que levar em conta o fato de que seja consequência do desconhecimento sobre o modo de ação das RPCPs e, de maneira mais ampla, sobre a interação dos microrganismos rizosféricos e as plantas.

CONCLUSÕES

1. Bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* atuam como promotoras de crescimento em alface.
2. A presença desse grupo na rizosfera de alface freqüentemente resulta em maior crescimento das plantas dessa espécie.
3. A capacidade de promoção de crescimento está possivelmente ligada a fatores nutricionais do substrato, os quais precisam ser mais bem definidos.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo financiamento de parte do trabalho; ao Dr. Pedro Roberto Furlani, pelo fornecimento da solução nutritiva, e a Maria Leonilde Machado de Souza, Maria Tereza Bueno Mangussi e Rosana Giertz Gonçalves, pelo apoio no laboratório e na casa de vegetação.

LITERATURA CITADA

- 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 Soil*, 204:57-67, 1998.
- BARAZANI, O. & FRIEDMAN, E. Effect of exogenously applied L-tryptoshan on allelochemical activity of plant growth - promoting rhizobacteria (PGPR). *J. Chem. Ecol.*, 26:343-349, 2000.
- BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: MELO, I.S. & SANHUEZA, R.M.V., eds. Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. Jaguariúna, EMBRAPA, 1995. p.35-36.
- BRANDÃO, E.M. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento em milho. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, 1989. 133p. (Tese de Mestrado)
- 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 Soil*, 200:205-213, 1998.
- DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. Écologie microbienne du sol. Paris, Masson Ci., 1970. 796p.
- FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. *R. Bras. Ci. Solo*, 13:31-34, 1989.
- FREITAS, S.S. Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1994. 112p. (Tese de Doutorado)
- FURLANI, A.M.C. & FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas, 1988. 34p. (Boletim Técnico, 121)
- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G. & DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification. *Soil Biol. Biochem.*, 24:979-987, 1992a.
- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G.; MERRIN, J. & DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. *Soil Biol. Biochem.*, 24:989-997. 1992b.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301-307, 1954.
- KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F.B., ed. *Soil microbial ecology*. New York, Marcel Dekker, 1993. p.255-274.
- KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4, Angus, 1978. Proceedings, Angus, 1978. v.2. p.879-882.

- MISAGHI, I.J. Screening bacteria for root colonizing ability by a rapid method. *Soil Biol. Biochem.*, 22:1085-1088, 1990.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.*, 33:603-612, 2001.
- SEONG, K.Y.; HÖFTE, M.; BOELENS, J. & VERSTRAETE, W. Growth survival and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biol. Biochem.*, 23:423-428, 1991.
- SIDDIQUI, Z.A.; IQBAL, A. & MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Appl. Soil Ecol.*, 16:179-185, 2001.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O. & CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. *R. Bras. Ci. Solo*, 19:205-211, 1995.
- STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J. & DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43:159-271, 1966.