

PSEUDOMONAS FLUORESCENTES ASSOCIADAS À CULTURA DE COUVE: INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO¹

VALÉRIA CRISTINA PALMEIRA ZAGO^{2*}, HELVÉCIO DE-POLLI³, NORMA GOUVÊA RUMJANEK³

RESUMO - A microbiota do solo tem um importante papel como indicadora da sustentabilidade dos agroecosistemas, refletindo as mudanças ambientais, especialmente, as ações antrópicas. Assim, objetivando avaliar a influência de diferentes adubos nas populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas na cultura de couve-comum, foi conduzido um experimento na Embrapa - Agrobiologia, Seropédica-RJ, em Argissolo Vermelho Amarelo. O experimento, com delineamento em blocos ao acaso, esquema fatorial 3 x 4, teve os tratamentos (adubação com biossólido domiciliar, esterco bovino e ureia) em quatro doses (0; 100; 200 e 400 kg de N.ha⁻¹) e, 4 repetições. A quantidade dos adubos aplicados deu-se em função da dosagem de nitrogênio.ha⁻¹ desejada. A partir do solo rizosférico, aos 15 e 30 dias após o transplântio das mudas para o campo, selecionaram-se isolados que apresentaram fluorescência sob luz UV, com comprimento de onda 366 nm. Para o agrupamento dos isolados consideraram-se as principais características morfológicas. Um representante de cada grupo foi analisado, sendo a maioria identificada como *Pseudomonas putida* (54%) e *P. fluorescens* (14%), pelo Sistema API 20NE (Biomérieux, Analytab Products). Os resultados obtidos a partir das reações dos testes do kit API 20NE mostraram uma grande variação na utilização de compostos de carbono e atividade enzimática inter e intraespecíficos. Alguns grupos de isolados colonizaram, preferencialmente, a rizosfera de plantas de couve adubadas com biossólido e diferentes doses dos adubos utilizados. Verificou-se um número menor de grupos presente nos tratamentos que receberam ureia.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* L. Diversidade microbiana. Biossólido. Uréia. Esterco bovino.

DIVERSITY OF FLUORESCENTS PSEUDOMONAS POPULATIONS ASSOCIATED WITH KALE: EFFECT THE FERTILIZERS

ABSTRACT - The microbiota soil has an important role as an indicator of the sustainability of agroecosystems, reflecting the environmental changes, particularly the anthropic actions. To evaluate the influence of different fertilizers in populations of *Pseudomonas* spp, in the common kale was conducted a field experiment with kale at the Agrobiology Embrapa National Center, in Seropédica, RJ, on a Argisol. The experimental design was random blocks in factorial 3 x 4, with treatments (home biosolid, cattle manure and urea fertilization), four dose levels (0, 100, 200 and 400 kg de N.ha⁻¹) and four replicates. The amount of fertilizer applied was given according to the dosage of nitrogen.ha⁻¹ desired. From the rhizosphere, at 15 and 30 days after transplanting the seedlings to the field, we selected strains showing fluorescence under UV light with a wavelength of 366 nm. For grouping the isolates were considered the main morphological characteristics. The majority being identified as *Pseudomonas putida* (54%) and *P. fluorescens* (14%), by API 20NE System (bioMérieux, Analytab Products). The results obtained from the reactions of the API 20NE test kit showed a wide variation in the utilization of carbon compounds and enzymatic inter-and intraspecific. Some groups of isolates colonized preferentially the cabbage rhizosphere of plants fertilized with biosolids and different doses of fertilizers used. There were a smaller number of groups present in treatments with urea.

Keywords: *Brassica oleracea* L. Microbial diversity. Biosolid. Urea. Cattle manure.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 19/07/2010; aceito em 18/03/2011.

Parte da Tese de Doutorado em Ciência de Solo do primeiro autor, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

²Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, av. Filinto Muller, 2443, B. Cidade Universitária, 79070-900, Campo Grande - MS; valeriana.zago@ufms.br

³Embrapa Agrobiologia, Rod. BR 465, km 7, 23890-000, Seropédica - RJ; norma@cnpab.embrapa.br; depollh@gmail.com

INTRODUÇÃO

A importância da biodiversidade do solo tem sido frequentemente estudada, em função do maior entendimento de sua extensa participação no funcionamento dos ecossistemas. Um aumento na biodiversidade microbiana nos ecossistemas está, em geral, associado à melhoria nas propriedades físicas e químicas do solo e, conseqüentemente, uma maior estabilidade do sistema (SAHA; MANDAL, 2009).

A manipulação das comunidades microbianas para promover interações benéficas com a planta, como a produção de fitohormônios, melhorar a disponibilidade de nutrientes e a supressão natural de doenças causadas por fitopatógenos, tem exigido uma maior compreensão sobre a influência dos fatores ambientais na dinâmica e atividade desses microrganismos (MARSCHNER et al., 2004).

Sabe-se que as alterações antrópicas (adubações, produtos químicos, etc) podem modificar significativamente a composição e a dinâmica ecológica microbiana do solo (MÄDER et al., 2002; TU et al., 2006).

Na rizosfera, onde a atividade microbiana é muito alta, tanto as populações de microrganismos, quanto a sua diversidade, podem responder drasticamente a essas mudanças. Em sistemas artificiais, como a agricultura, há uma modificação no balanço natural das populações microbianas que pode conduzir a perdas de microrganismos benéficos e/ou facilitar o ingresso de fitopatógenos, com efeitos devastadores na produtividade das plantas (GARBEVA et al., 2006; AVIS et al., 2008).

A aplicação de fertilizantes afeta direta e indiretamente a composição da comunidade microbiana do solo sob sistema de monocultura (WARDLE et al., 1999; SANTOS et al., 2009). Estudos têm mostrado que a utilização de adubos orgânicos beneficia a microbiota do solo, especificamente aumentando a população de promotores de crescimento de planta e supressores de doenças e pragas (SIDDIQUI, 2004; SAHNI et al., 2008).

Apesar disso, os impactos específicos dos manejos agrícolas sobre a biodiversidade das bactérias probióticas ainda são pouco estudados (PICARD; BOSCO, 2008). No entanto, já se sabe que, dentre esses microrganismos, encontram-se as *Pseudomonas* spp. fluorescentes, produtoras de compostos antimicrobianos, envolvidas na supressão de numerosos fitopatógenos de solo, incluindo bactérias, fungos e nematóides (RAAIJMAKERS et al., 2009).

A comparação da diversidade genética e funcional de *Pseudomonas* spp. fluorescentes indígenas em diferentes rizosferas, poderá ser útil na elucidação da adaptação dessas bactérias a diversos manejos agrícolas (CHANG et al., 2008).

Este trabalho avaliou a influência de diferentes fertilizantes (esterco bovino curtido, ureia e biossólido, nas populações de *Pseudomonas* spp. fluores-

centes nativas, presentes na rizosfera de couve-comum.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziu-se o experimento no campo experimental da Embrapa- Agrobiologia, Seropédica-RJ, com cultura de couve-comum (*Brassica oleracea* var. *acephala*, grupo Geórgia), com espaçamento de 1,0m x 0,5 m e parcelas com 12 m², em Argissolo Vermelho Amarelo. A análise do solo (0-20 cm) apresentou as seguintes características físico-químicas: textura média; pH: 5,2; Al= 1 cmol_c.kg⁻¹; Ca=13 cmol_c. kg⁻¹; Mg= 6 cmol_c. kg⁻¹; P=25mg. kg⁻¹ e K= 52mg kg⁻¹.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 4, com os tratamentos (esterco bovino, ureia e biossólido domiciliar), quatro doses (0, 100, 200 e 400 kg.ha⁻¹ de Nitrogênio) e 4 repetições. O biossólido utilizado procedeu da estação de tratamento de águas servidas domiciliares do Instituto Ambiental de Petrópolis, RJ. A quantidade dos adubos aplicados teve como base a dose de N desejada (0, 100, 200 e 400 kg.ha⁻¹ de N) equivalentes a 0, 4,8 e 9,5 t.ha⁻¹ de esterco; a 0, 50 e 100 t.ha⁻¹ de biossólido e a 0, 200, 400 e 800 kg.ha⁻¹ de ureia.

A análise química do biossólido apresentou: pH (água)= 4,6; MO= 57 g. kg⁻¹; N= 2,1 g. kg⁻¹; P=0,54 g. kg⁻¹; K=1,75 g. kg⁻¹; Ca= 22,0 g. kg⁻¹; resíduo mineral total (RMT)= 943 g. kg⁻¹ e umidade a 65°C =1,24%. O esterco apresentou pH (água)= 7,9; MO= 500 g. kg⁻¹; N=20,8 g. kg⁻¹; P= 3,38 g. kg⁻¹; K= 11,0 g. kg⁻¹; Ca=33,4 g. kg⁻¹; RMT=500 g.kg⁻¹ e umidade a 65°C = 20,7%.

Os teores de metais pesados no biossólido foram: 0,5; 2,8; 3,7; 44 e 16,2 mg.kg⁻¹ para Cd; Cr; Cu; Ni e Pb; não foram detectados presença de Zn, Mo e Se nas amostras. Esses teores estão bem abaixo do permitido pela legislação internacional (CANTARELLA et al., 1996).

O solo rizosférico foi amostrado, num diâmetro de 10 cm ao redor das plantas e 15 cm de profundidade, aos 15 e 30 dias após o transplantio das mudas para o campo. Em função de má drenagem do solo em parte da área experimental, duas parcelas do tratamento com o adubo ureia, na dose de 400 kg.ha⁻¹ N foram perdidas, na coleta aos 30 dias.

Dez gramas desse solo foram processadas através de diluição seriada até 10⁻⁴, utilizando-se como solução extratora MgSO₄. 7 H₂O 0,1 M. Transferiram-se alíquotas de 100 ml de cada diluição, em duplicata, para o centro de placas de Petri, contendo meio seletivo King B modificado com antibióticos: ciclohexanina – 100 ppm, ampicilina – 50 ppm e cloranfenicol – 12,5 ppm (KING et al., 1954; GELLS; SCHIPPERS, 1983) e espalhadas com alça de Drigalski.

Após incubação das placas, de 27 a 30 °C por

48 horas, as bactérias visualmente diferentes, foram purificadas em nova placa com o mesmo meio de crescimento. Para a preservação dos isolados utilizaram-se glicerol 50%, em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e meio KB líquido + 50% glicerol a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os isolados com fluorescência sob luz UV, em comprimento de onda 366nm foram selecionados para caracterização morfológica da colônia, seguindo os critérios: tamanho (puntiforme, entre 1-2 mm e >2 mm); forma (circular ou irregular); borda (lisa ou denteada); colônia (homogênea ou heterogênea); transparência (opaca ou transparente); presença muco-quantidade (pouca, média ou muita), elasticidade (pouca ou muita), presença de elevação (sim ou não) e cores (amarelo claro, amarelo forte, amarelo esverdeado e creme).

A partir das principais características morfológicas, um isolado, de cada um dos grupos mais representativos quantitativamente, foi identificado pelo Sistema de Perfis Fisiológicos API 20NE (Biomérieux Analytab Products). As galerias de testes, após inoculação com os isolados, ficaram incubadas por 24 e 48 h, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo usados os resultados de 48 h, com exceção dos testes com os substratos (nitrato de potássio, triptofano e glicose), cujas leituras se deram com 24 h.

Com os dados da classificação do API 20 NE, montou-se uma matriz de similaridade empregando o programa de computador (NTSYS), através do coeficiente de similaridade (Coincidência Simples-SM) e, posteriormente, realização de análise estatística não-paramétrica para construção de um dendrograma pelo método de distância matriz (UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (ROHLF, 1994).

Os dados morfológicos quando comparados aos obtidos pelo API 20NE, geraram reagrupamento dos isolados. Os dados transformados (log) da densidade de isolados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a densidade de células bacterianas isoladas em meio King B não foi observada diferenciação quanto à densidade de isolados entre as coletas realizadas (15 e 30 dias após o transplantio), dados não mostrados e, entre os tratamentos com esterco, biossólido e ureia (Figura 1A). Todavia, houve influência em função das doses utilizadas, onde as quantidades de 100 e 200 kg de $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ afetaram de forma equivalente, sendo que esta última igualou-se ao controle (Figura 1B).

Em vários experimentos conduzidos na Índia, observou-se que a estrutura da comunidade bacteriana em lavouras, com alta adição de fertilização foi muito diferente daquelas que receberam baixa fertilização (ROESTI et al., 2006). Além disso, na presen-

ça de nível ótimo de fertilizante nitrogenado, a inoculação com rizobactérias contendo atividade de ACC-deaminase pôde, efetivamente, melhorar o crescimento e produção das plantas inoculadas (SHAHAROONA et al., 2006).

Sarathchandra et al. (2001), entretanto, não observaram diferença significativa entre doses crescentes de ureia (0, 200 e 400 kg de $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$) em bactérias totais e microrganismos celulolíticos, em solos sob pastagens.

A densidade de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes também se mostrou igual entre os tratamentos que receberam adubação química convencional e adubação verde com centeio/ervilhaca no plantio de tomate. Na colheita, observou-se aumento em todos os tratamentos (químico, adubação verde com centeio/ervilhaca, composto de resíduos do beneficiamento de algodão e biossólido de esterco suíno), sendo as densidades maiores na adubação química, compostagem e adubação verde. No entanto, este último não foi significativamente diferente do biossólido de esterco suíno (BULLUCK; RISTAINO, 2002).

A avaliação do efeito da aplicação de diferentes compostos orgânicos, sobre a microflora da rizosfera de tomate, também mostrou pouca diferença no número de microrganismos totais (bactérias, fungos e actinomicetos). Contudo, afetaram a composição das espécies na rizosfera, causando uma mudança nos grupos específicos de microrganismos, tais como, antagonistas a patógenos e/ou outros grupos funcionais de rizobactérias (ALVAREZ et al., 1995).

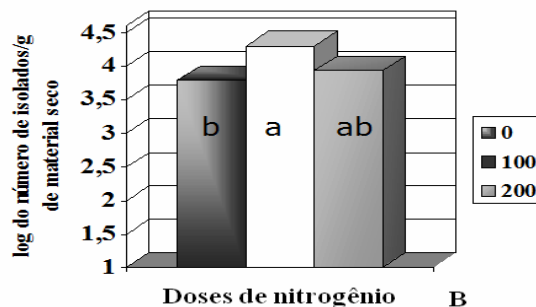
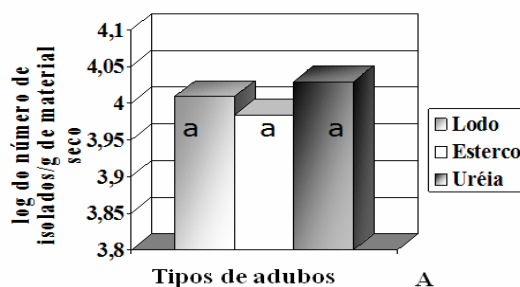


Figura 1. Densidade média de isolados obtidos de extrato de rizosfera de plantas de couve, adubadas com diferentes tipos de adubos (esterco, biossólido domiciliar-lodo e ureia) (A), em doses equivalentes a 0, 100 e 200 kg de $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ (B).

No tocante a caracterização fenotípica, utilizando o sistema API 20NE, as características morfológicas (elasticidade, tamanho, transparência, cor, aspecto, borda e elevação da colônia), os isolados foram agrupados em 100% de similaridade em 44 grupos. Utilizaram-se 44 isolados, dentre os 44 grupos morfológicos (GM), no entanto, dezessete grupos com pequeno número de isolados não foram identificados pelo kit API 20NE.

Apenas quatro grupos representaram 48% do total de isolados da coleção. A maioria dos isolados é de *Pseudomonas putida* (54%) e *Pseudomonas fluorescens* (14%). Cerca de 16% dos isolados ficaram sem uma identificação precisa quanto à espécie, ficando entre *P. fluorescens*/*P. aeruginosa* (Tabela 1). Lemanceau et al. (1995) classificaram como tipos “intermediários”, os isolados categorizados, por API 20, entre *P. fluorescens* e *P. putida*.

Tabela 1. Número de isolados obtidos de extrato de rizosfera de couve sob cultivo convencional, com doses equivalente a 0, 100, 200 e 400 kg de N.ha⁻¹, em relação às espécies identificadas pelo kit API 20 NE.

Espécies	Número de isolados
<i>Pseudomonas putida</i>	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>P. fluorescens</i> / <i>P. aeruginosa</i>	7
<i>P. putida</i> / <i>P. mendocina</i>	1
<i>Ochrabacter antropi</i>	2
<i>Comomonas acidovorora</i>	1
Total	44

Comparando-se a diversidade funcional de *Pseudomonas* fluorescentes da rizosfera de milho, observou-se que *P. putida* foi predominante em relação às demais espécies (CHANG et al., 2008), similarmente ao observado na rizosfera de linho (LEMANCEAU et al., 1995), batata (LOTTMANN; BERG, 2001) e canola (MISKO; GERMIDA, 2002).

Elaborou-se uma matriz de similaridade entre os isolados bacterianos identificados pelo kit API 20NE, utilizando o coeficiente SM. Os isolados identificados pelo kit API 20NE foram agrupados à aproximadamente 90% de similaridade em 11 grupos (Figura 2).

Costa et al. (2006) observaram, também utilizando o sistema API, a existência de 8 grupos fenotí-

picos diferentes de *P. putida* (94 isolados) e 8 grupos de *P. fluorescens* (29 isolados), sugerindo um certo grau de diversidade intra-específica dentre os isolados da rizosfera de duas cultivares de milho, em sistema de produção orgânico.

Mutações espontâneas formam a base para as variações fenotípicas em *Pseudomonas*, possivelmente regulando a variabilidade das características morfológicas e bioquímicas das espécies. Essas variações podem aumentar a diversidade das populações e pode ter um efeito positivo no sucesso na colonização das mesmas (VAN DEN BROEK et al., 2005).

Coincidindo com análise numérica dos dados fenotípicos obtidos com a utilização do kit API 20 NE deste experimento, Moore et al. (1996) estudando a determinação e comparação das seqüências de genes da região 16S rRNA do gênero *Pseudomonas* e estimativa das relações intragênicas, mostraram as similaridades evolucionárias das principais espécies deste gênero com a espécie tipo *P. aeruginosa*, onde *P. mendocina*, *P. fluorescens* e *P. putida* têm 99,4; 98,5 e 99,2%, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir das reações dos testes do kit API 20NE mostraram uma grande variação na utilização de compostos de carbono e atividade enzimática inter e intra-específicos. A habilidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em utilizar substratos orgânicos específicos pode ser uma importante característica envolvida na seleção destes microrganismos, representando a diversidade funcional existente, definida como o número, tipos, atividades e taxas em que um conjunto de substratos é utilizado pela comunidade microbiana (EGAMBERDIYEVA, 2005).

Essas informações são de grande utilidade, pois quando introduzido na rizosfera, um inoculante bacteriano com habilidade para utilizar um compos-

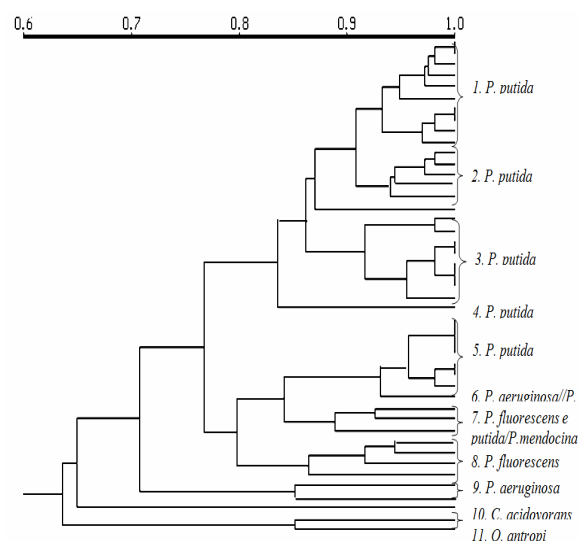


Figura 2. Dendrograma das similaridades fenotípicas dos isolados identificados por API 20 NE (somatório dos tratamentos), a partir de extrato de rizosfera de couve adubada com diferentes fontes e doses de adubos.

to presente no substrato ou nos exsudatos da raiz, teria uma vantagem competitiva sobre as bactérias do solo sem esta habilidade (EGAMBERDIYEVA; HÖFLICH, 2004).

Para o agrupamento dos isolados pelos adubos e doses utilizadas, fixou-se tanto para blocos e coletas, a presença de apenas 01 (um) exemplar por grupo morfológico. Este critério possibilitou uma análise semiquantitativa da distribuição dos isolados.

Considerando-se os grupos mais abundantes, compreendendo 50% do total de isolados obtidos para a cultura de couve através do método semiquantitativo, pôde-se observar entre os três tipos de adubos, que o biossólido apresentou maior número de grupos (8), enquanto esterco e ureia apresentaram seis (6) grupos. Porém, a maioria dos grupos é comum entre os adubos. Apenas o biossólido apresentou três grupos preferenciais (5, 30 e 37) (Figura 3).

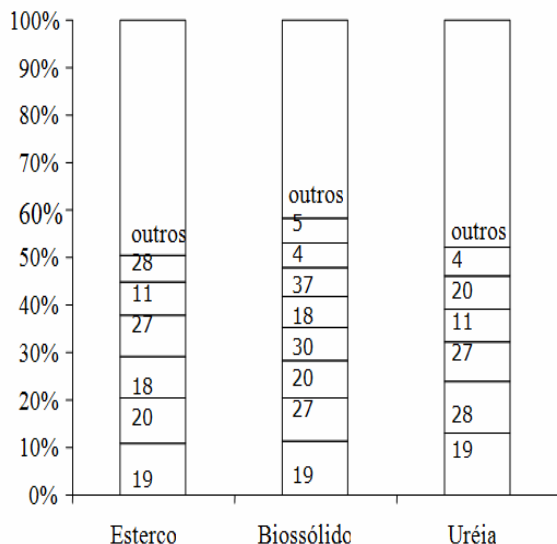


Figura 3. Grupos morfológicos mais abundantes das médias de isolados originados de extrato de plantas de couve sob cultivo convencional com doses equivalentes de 0, 100, 200 e 400 kg de N.ha⁻¹ de ureia, esterco e biossólido seco ao ar.

O biossólido pode ter estimulado especificamente estes grupos, diretamente por meio do incremento de nutrientes, compostos orgânicos e/ou indiretamente, melhorando as condições físicas do solo necessárias ao desenvolvimento destes isolados.

Aplicações de 70 t.ha⁻¹ de biossólido tiveram efeito significativo, a longo prazo, sobre a química do solo, estrutura e riqueza das espécies da comunidade microbiana nas pastagens semi-áridas do norte do Colorado (SULLIVAN et al., 2006).

Freitas et al. (2003) sugeriram que aspectos nutricionais do substrato em que se desenvolveram plantas de alface deveriam influenciar a capacidade de promoção do crescimento por bactérias *Pseudomonas* fluorescentes. A enumeração desse grupo de bactérias na rizosfera de plantas cítricas mostrou que

o seu desenvolvimento também foi influenciado pelo substrato e pelo ambiente, especialmente pela rizosfera (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004). Verificaram-se também, grupos exclusivos de bactérias de rizosfera, adubadas com quitina, quando comparado com solo não recebeu esse produto orgânico (HALLMANN et al., 1999).

O agrupamento dos isolados com relação às doses dos fertilizantes considerou a correspondência entre os grupos morfológicos e a caracterização pelo API 20NE. Observou-se que alguns grupos de bactérias presentes no solo foram mais estimulados do que outros, em relação ao controle. Para os tratamentos com esterco, na dose de 100 Kg de N.ha⁻¹, o grande grupo III destacou-se, havendo uma predominância de isolados de *P. fluorescens*/*P. aeruginosa*. Nas doses 200 e 400 kg N.ha⁻¹, no entanto, foi o grupo VI, predominando *P. putida* (Figura 4A).

Nos tratamentos que receberam o biossólido, pôde-se observar na dose de 100 kg de N.ha⁻¹, o incremento dos grupos VI, VII (predominam *P. putida*) e XI (*P. aeruginosa*). Na dose 200 kg de N.ha⁻¹, os grupos I (*P. putida* e *P. fluorescens*), VI, VII e IX (*P. aeruginosa*) destacaram-se, entretanto, para a dose 400 kg de N.ha⁻¹, o grupo VI e VII continuaram expressivos, enquanto decaíram os grupos I e IX. Nos tratamentos com ureia, apenas a dose 100 kg de N.ha⁻¹ estimulou o grupo XII, representado pela espécie *P. putida*. Verificou-se um número menor de grupos nos tratamentos que receberam ureia em relação àqueles que receberam esterco ou biossólido (Figura 4B e C).

A diversidade microbiana num solo adubado com fertilizante orgânico foi muito maior que em solo mineral. Uma possível explicação para esta diferença poderia ser a grande variabilidade de substratos encontrados nos solos orgânicos (ØVREÅS; TORSVIK, 1998). Ademais, em outro estudo, observou-se que a diversidade funcional da microbiota do solo diminuiu, consistentemente, como resultado da aplicação de altas doses de ureia (SARATHCHANDRA et al., 2001).

Garbeva et al. (2006) também observaram que diferentes práticas de manejos agropecuários interferem na diversidade e a estrutura das populações microbianas do solo. Pastagens naturais, como maior número de espécies vegetais, também apresentaram maior diversidade entre as populações de *Pseudomonas* e *Bacillus*, em relação às culturas anuais, produzidas no sistema convencional.

As diferentes formas de variações fenotípicas são relevantes para as bactérias rizosféricas, introduzindo diversidade dentro das populações, o que permite a formação de populações intraespecíficas. Mudanças ambientais bruscas podem estimular mudança rápida do perfil das populações microbianas. A observação de que esses mecanismos estão ativos nas *Pseudomonas* competentes na colonização da rizosfera, sugere que existe uma estratégia conservativa para aumentar seu sucesso nesse microambiente (VAN DEN BROEK et al., 2005).

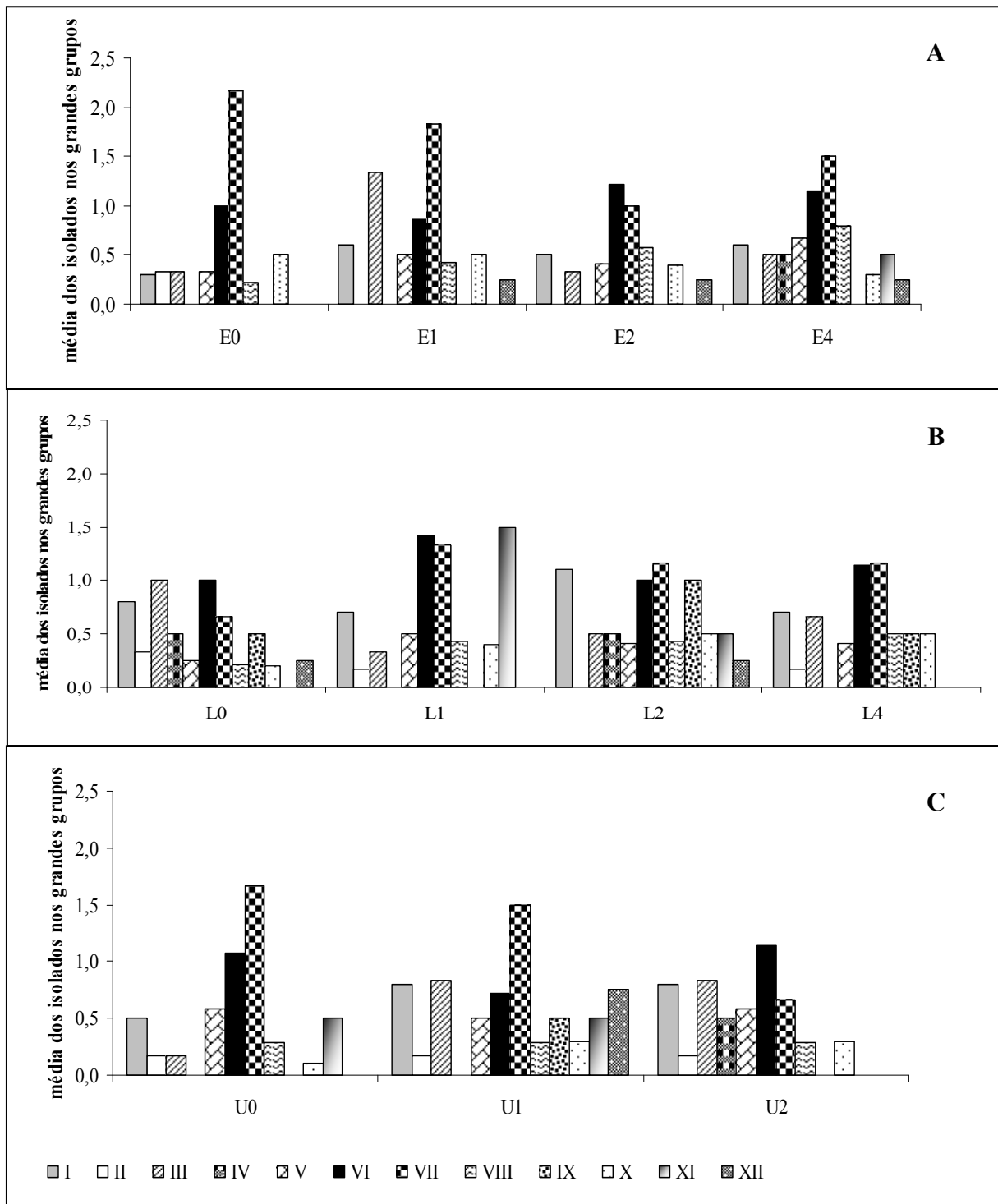


Figura 4. Distribuição dos isolados nos grandes grupos (GG), no extrato de rizosfera de plantas de couve, sob cultivo convencional com doses crescentes de ureia (0, 100, 200 e 400 kg N.ha⁻¹), esterco e biossólido seco ao ar, considerando-se os grupos morfológicos entre parênteses: GGI (1-5); GGII (6-8); GGIII (9-12); GGIV (13); GGIV (14-18); GGVI (19-25); GGVII (26-28).

CONCLUSÕES

A identificação taxonômica dos isolados feita através do kit API 20 NE é precisa em nível de gênero e em torno de 86% para as espécies *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*;

Os resultados obtidos a partir das reações dos testes do kit API 20NE mostram uma grande variação na utilização de compostos de carbono e atividade enzimática inter e intraespecíficos;

Entre os grupos mais abundantes observam-se alguns grupos de isolados preferenciais em colonizar

a rizosfera de plantas de couve adubadas com biossólido e entre as doses dos adubos, entretanto, também se verificou um número menor de grupos presente nos tratamentos que receberam ureia.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado à primeira autora. Ao João Luiz Bastos e à Aline de Fátima Santos Câmara por colaborarem na condução dos trabalhos de campo e laboratório.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M. A. B.; GAGNÉ, S.; ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 194-199, 1995.
- AVIS, T. J. et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant and productivity. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1733-1740, 2008.
- BIOMÉRIEUX. **Analytical profile index**: API 20 NE. Durham-USA: Biomérieux Analytab Products, 1997. 251 p.
- BULLUCK III, L. R.; RISTAINO, J. B. Effect of synthetic and organic soil fertility amendments on southern blight, soil microbial communities, and yield of processing tomatoes. **Biological Control**, v. 92, n. 2, p. 181-189, 2002.
- CANTARELLA, H. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 285 p. (Boletim Técnico, 100).
- CHANG, C. Y.; CHAO, C. C.; CHAO, W. L. Community structure and functional diversity of indigenous fluorescent *Pseudomonas* of long-term swine compost applied maize rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 495-504, 2008.
- COSTA, R. et al. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize in a subtropical organic farm. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2434-2447, 2006.
- EGAMBERDIYEVA, F. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of plants grown in serozem soil, semi arid region of Uzbekistan. **The Scientific World Journal**, v. 5, n. 7, p. 501-509, 2005.
- EGAMBERDIYEVA, F.; HÖFLICH, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi arid region of Uzbekistan. **Journal of Arid Environments**, v. 56, n. 3, p. 293-301, 2004.
- FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção de crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 6, p. 987-994, 2004.
- FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 6, p. 61-79, 2003.
- GARBEVA, P. et al. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 233-246, 2006.
- GEELS, F. P.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 108, n. 3-4, p. 207-214, 1983.
- HALLMANN, J.; RODRIGUES-KÁBANA, R.; KLOPPER, J. W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 551-560, 1999.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.
- LEMANCEAU, P. et al. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1004-1012, 1995.
- LOTTMANN, J.; BERG, G. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. **Microbiology Research**, v. 156, n. 1, p. 75-82, 2001.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 199-208, 2004.

- MÄDER, P. et al. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1694-1697, 2002.
- MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the root of field – grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, n. 3, p. 399-407, 2002.
- MOORE, E. R. B. et al. The determination and comparison of the 16s rRNA gene sequence of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intragenetic relationships. **Systematic Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 478-492, 1996.
- ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial Diversity and Community Structure in Two different Agricultural Soil Communities. **Microbial Ecology**, v. 36, n. 3, p. 303-315, 1998.
- PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 1, p. 1-16, 2008.
- RAAIJMAKERS, J. M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 341-361, 2009.
- ROESTI, D. et al. Plant growth stage, fertilizer management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal Fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1111-1120, 2006.
- ROHLF, F. J. NTSYS-PC - **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Exeter Software. New York: University of New York, 1994. CD-ROM.
- SAHA, N.; MANDAL, B. Soil Health-The precondition for crop production. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial Strategies for crop improvement**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 161-184.
- SAHNI, S. et al. Vermicompost enhances performance of plant growth-promoting rhizobacteria in *Cicer arietinum* rhizosphere against *Sclerotium rolfsii*. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 369-376, 2008.
- SANTOS, T. M. C. et al. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 155-160, 2009.
- SARATHCHANDRA, S. U. et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 7-8, p. 953 -964, 2001.
- SHAHAROONA, B. et al. Performance of *Pseudomonas* spp. Containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 2971-2975, 2006.
- SIDDIQUI, Z. A. Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 223-227, 2004.
- SULLIVAN, T.S; STROMBERGERA, M.E.; PASCHKE, M. W. Parallel shifts in plant and soil microbial communities in response to biosolids in a semi-arid grassland. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 449-459, 2006.
- TU, C.; RISTAINO, J. B.; HU, S. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: Effects of organic inputs and straw mulching. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 247-255, 2006.
- VAN DEN BROEK, D.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1686-1697, 2005.
- WARDLE, D. A. et al. Plant removals in perennial grassland: vegetation dynamics, decomposers, soil biodiversity, and ecosystem properties. **Ecological Monographs**, v. 69, n. 4, p. 535-568, 1999.