

---

## *Importância da Rizosfera na Biodegradação de Xenobióticos*

---

Itamar Soares de Melo



Foto: I.S. Melo

## I. Introdução

As bactérias têm uma função importante na atenuação do impacto ambiental dos compostos orgânicos, uma vez que podem adaptar-se à presença desses poluentes e/ou utilizá-los como nutrientes.

A identificação de linhagens bacterianas envolvidas na biodegradação de compostos orgânicos recalcitrantes oferece uma oportunidade para utilização prática visando a remediação de sítios contaminados disponíveis.

A rizorremediação inclui processos que envolvem a biodegradação de poluentes orgânicos por microrganismos que colonizam as raízes de plantas.

A porção do solo imediatamente associada às raízes de plantas em crescimento é conhecida como rizosfera, que é caracterizada, fundamentalmente pelo contínuo suprimento de compostos orgânicos de baixo peso molecular secretados pelas raízes. Estes compostos servem como fonte de carbono e energia para a grande comunidade de bactérias. A tecnologia de biorremediação baseada no sistema rizosfera (planta – bactérias) é um processo atrativo, pois as raízes fornecem uma grande área superficial para populações bacterianas e transporte de microrganismos envolvidos na biodegradação de poluentes.

A maior diversidade e densidade de bactérias comumente observada na rizosfera, comparada com comunidades microbianas menos diversas em solos não-rizosféricos, frequentemente, resulta em maiores taxas de metabolismo de xenobióticos. Na rizosfera, os microrganismos evoluíram mecanismos genéticos que lhes permitiram degradar compostos naturais complexos, como por exemplo, diterpenos, lignina, celulose, matérias húmicos.

Compostos químicos sintéticos, contendo novas estruturas, fornecem oportunidades para que bactérias possam se adaptar e evoluir novas vias de degradação, uma vez que a biodegradação pode requerer enzimas que estão ausentes nos microrganismos ou que tenham uma atividade extremamente baixa.

Dentro desse enfoque, tem sido já bem documentado que existe incremento da degradação de xenobióticos na rizosfera ocasionado por uma comunidade microbiana sinérgica e diversa, fato este não verificado por uma simples linhagem bacteriana.

Dentre as rizobactérias que colonizam a rizosfera e com potencial de uso em biorremediação e na agricultura, visando aumento da produtividade, destacam-se: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre outras. Bactérias localizadas na rizosfera, possuindo potencial catabólico para diferentes tipos de poluentes podem servir como base para biorremediação. Assim, bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* são excelentes organismos para esse propósito, pois colonizam o rizoplano e a rizosfera, ao mesmo tempo que apresentam propriedades extras como

a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. *Pseudomonas*, no entanto, é o gênero mais estudado devido, principalmente a sua capacidade de metabolizar diversas substâncias xenobióticas. Por exemplo, linhagens de *Pseudomonas putida* tem sido envolvidas no catabolismo de produtos naturais (vanilina,  $\delta$ -pipeno, limonocânfora, mandelato e adamantanona) e compostos industriais (bromoxinil, estireno, metil-test-butil éter (MTBE), tricloetileno e nitroglicerina). Genes codificando vias catabólicas para protocatecato, catecol, p-hidroxibenzoato, vanilina e anisulfonatos já foram identificados no genoma de *P. putida* K2440 (NELSON *et al.*, 2002; JIMENEZ *et al.*, 2002).

O seqüenciamento do genoma mostrou que o metabolismo dos ácidos aromáticos faz com que esta bactéria se associe com raízes de plantas. Genes que poderiam contribuir com a capacidade de *P. putida* K2440 de associar-se com raízes de plantas incluem aqueles responsáveis pela biossíntese de celulose, biossíntese de carboidratos complexos e o catabolismo de opinas e outros produtos secretados pelas plantas.

Ao contrário de *P. aeruginosa*, *P. putida* não é patogênica às plantas e nem aos animais. Esta característica faz com que esta bactéria apresente potencial extraordinário para aplicações ambientais e industriais.

## 2. O ambiente rizosfera

O conceito “rizosfera” foi definido primeiramente por Hiltner em 1904 e compreende aquela porção do solo sob influência direta das raízes de plantas superiores, em máxima atividade microbiana (Figura 1). As raízes podem liberar consideráveis quantidades de exsudados, lisados e mucilagens. É, portanto, estimado

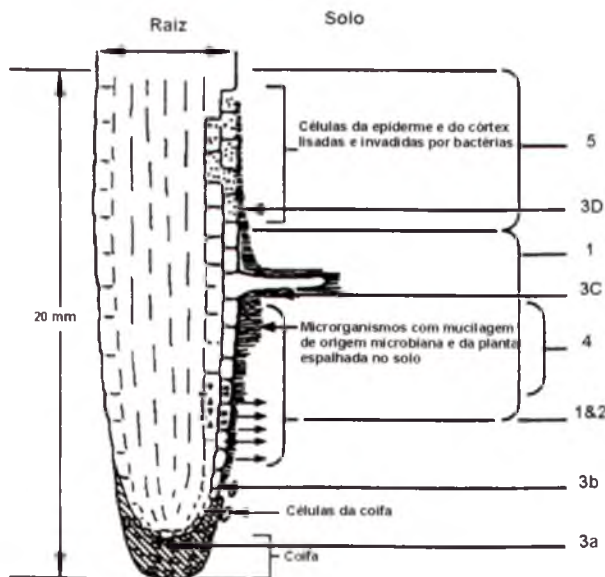


FIGURA 1. Diagrama de um modelo de raiz mostrando a origem de vários compostos orgânicos presentes na rizosfera. 1. exsudados radiculares; 2. secreções; 3. mucilagens de origem vegetal; 4. mucigel; 5. lisados. (ROVIRA *et al.*, 1979).

que plantas liberem 20–40% de seus fotossintetatos via raízes. A liberação de nutrientes orgânicos, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, vitaminas, fitohormônios e outras substâncias fornecem a base para o crescimento e atividade de microrganismos na rizosfera. Estudos microscópicos revelam que bactérias dominam a rizosfera (Figuras 2 e 3). Colônias microbianas se desenvolvem ao longo da superfície radicular, com máximo desenvolvimento naqueles sítios onde todos os pré-requisitos para o crescimento são encontrados.

A localização sobre o sistema radicular em que esses compostos orgânicos podem ser liberados pode ser melhor ilustrada na Figura 1.

A rizosfera é um ambiente único do sistema solo. Os microrganismos predominantes na rizosfera são habitantes do solo e, portanto, com características da microbiota do solo. Por sua vez, a composição da comunidade vegetal pode influenciar a diversidade da comunidade bacteriana devido à variabilidade na composição química dos exsudados (CHRISTENSEM, 1989). As bactérias com maior número de habitats da rizosfera, as Gram-negativas, em forma de bastonetes não esporulantes e com simples requisitos nutricionais, são mais estimuladas pelas raízes do que bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes e cocos esporulantes (CURL & TRUELOVE, 1986).

Populações maiores do que  $10^9 \text{g}^{-1}$  solo rizosférico são comumente detectadas. Estimulação seletiva de bactérias gram-negativas, de rápido crescimento, como, por exemplo, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes* e *Agrobacterium* é observada na rizosfera. Estes gêneros são encontrados como microcolônias cobrindo, aproximadamente, 4-10% da superfície radicular. A competição intermicrobiana na rizosfera envolve taxa de crescimento, versatilidade metabólica, fatores de crescimento, área superficial disponível para o desenvolvimento colonial e produção de antibióticos.



FIGURA 2. Colonização de raízes por bactérias. a) coifa; b) colonização dos sulcos da epiderme da raiz; c) detalhe da colonização de bactérias em raízes.

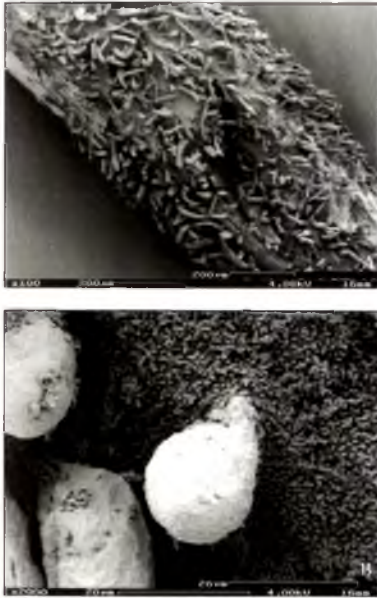


FIGURA 3. Colonização de pêlos radiculares por bactérias. a) pêlos radiculares; b) detalhe da colonização abundante de bactérias na base dos pêlos radiculares.

Tem sido demonstrado com muita freqüência que a rizosfera difere do solo sem vegetação de várias maneiras:

**a) Composição de íons inorgânicos:** Geralmente há uma diminuição na concentração de fosfato próximo às raízes devido à rápida absorção pelas raízes e baixa difusão através do solo (LEWIS & QUIRK, 1967).

**b) pH:** O pH da rizosfera é influenciado pela forma de fertilizante nitrogenado aplicado às plantas. Nitrato tende a elevar o pH da rizosfera, visto que fertilizante amoniacal diminui o pH. Essas diferenças no pH podem causar grandes mudanças na microbiota (SMILEY, 1974).

**c) Níveis de oxigênio e dióxido de carbono:** Mudanças nas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na rizosfera são, muitas vezes, acentuadas sob condições de baixa drenagem dos solos. A ocorrência de clostridio anaeróbico na rizosfera sugere baixos níveis de oxigênio em microsítios das raízes (ROVIRA, 1962).

O efeito rizosfera é um estímulo ao crescimento microbiano ao redor das raízes. Substâncias voláteis podem se difundir no solo a distâncias maiores do que as substâncias solúveis em água e podem estimular a germinação de esporos fúngicos ou atrair nematóides a maiores distâncias das raízes.

Uma grande variedade de compostos orgânicos de origem vegetal têm sido encontrados na rizosfera e foram classificados por Rovira *et al.* (1979) como:

1) **Exsudados** - compostos de baixo peso molecular (açúcares, aminoácidos);

2) **Secreções** - compostos que são liberados ativamente pelas células da raiz;

3) **Mucilagem**

3.1 Secreções produzidas pelo complexo de Golgi das células da coifa;

3.2 Hidrolisados da parede celular primária localizada entre a coifa e a epiderme;

3.3 Secreções pelas células da epiderme e pelas radículas com parede primária;

3.4 Compostos resultantes da degradação microbiana e modificação das células mortas da epiderme;

4) **Mucigel** - material gelatinoso da superfície radicular, composto de mucilagem vegetal, células bacterianas, produtos metabólitos e material mineral e orgânico coloidal.

5. **Lisados** - material liberado pela lise de células velhas da epiderme.

Já é bem estabelecido que diferentes espécies de plantas liberam diferentes compostos orgânicos na rizosfera. O estágio de desenvolvimento da planta também pode afetar a composição de substâncias liberadas pelas raízes para a rizosfera. À medida que a planta envelhece, tanto a quantidade como a composição de compostos orgânicos que são exsudados frequentemente mudam (HALE *et al.*, 1978; VANCURA & STANEK, 1975). Fatores outros, como temperatura, radiação, umidade do solo, condição nutricional do solo e estresse às raízes podem alterar a quantidade e composição de exsudados das raízes. Uma diminuição na iluminação, por exemplo, geralmente diminui a exsudação, presumidamente por causa de um decréscimo na fixação de C.

### 3. Exsudados

A presença de microrganismos na rizosfera incrementa a exsudação radicular. Barber & Martin (1976) encontraram que 5-10% do C fixado fotossinteticamente foi exsudado de raízes de cevada sob condições axênicas, mas quando microrganismos foram introduzidos, a exsudação foi aumentada para 12-18%.

Exsudados de plantas são essenciais para a associação de bactérias com a rizosfera, como mostrado por Belimov & Dietz (2000) que demonstraram que a adição de uma fonte alternativa de carbono ao solo, abole a promoção do crescimento da planta em um solo contaminado.

A composição de exsudados radiculares é um parâmetro primário na seleção de espécies ativas quanto a comunidade da rizosfera e a diversidade daquela comunidade. A composição de exsudados radiculares varia com as condições de crescimento da planta e seu estágio de desenvolvimento. Os compostos orgânicos acumulados nos exsudados incluem:

- **Aminoácidos:** todos aminoácidos de ocorrência natural;
- **Ácidos orgânicos:** ácidos acético, butírico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, málico, oxálico, propiônico, tartárico e valérico;
- **Pentoses e hexoses:** arabinose, deroxirribose, frutose, galactose, glucose, maltose, manose, rafinose, ramnose, ribose, sucrose e xilose;
- **Pirimidinas e purinas:** adenina, timina, guanina, unidina;
- **Vitaminas:** p-aminobenzoato, biotina, colina, inositol, ácido nicotínico, pantotenato, piridoxina e tiamina;
- **Enzimas:** amilase, invertase, fosfatase e protease.

## 4. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCPs

Rizobactérias são assim denominadas por colonizarem intensamente o sistema radicular das plantas (SCHROTH & HANCOCK, 1981; KLOEPPER, 1983). Quanto aos efeitos causados às plantas são divididas em benéficas, prejudiciais ou neutras (SCHIPPERS *et al.*, 1987). As bactérias de vida livre do solo que beneficiam as plantas são, comumente, denominadas “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (RPCPs) (KLOEPPER *et al.*, 1989).

A utilização das RPCPs, visando ao aumento do crescimento de plantas e, conseqüentemente, da produção, teve início na Rússia na década de 30. Contudo, somente na década de 60 respostas positivas no aumento de crescimento de plantas foram obtidas com a bacterização de sementes de algumas plantas agrícolas com *Azotobacter* sp. (ROVIRA, 1963; BROWN *et al.*, 1962, 1964). Os mecanismos, no entanto, pelos quais essas bactérias estimulam o crescimento de plantas não ficaram claros na época.

Mais tarde, alguns pesquisadores detectaram a produção de fitohormônios, como o ácido giberélico e o ácido indol-acético por algumas espécies bacterianas em meio de cultura, sendo sugerida a sua produção como o possível mecanismo na promoção de crescimento de plantas (KATZNELSON & COLE, 1965; BROWN, 1972).

Dentre as RPCPs, bactérias do gênero *Pseudomonas*, produtoras de pigmentos fluorescentes são as mais estudadas com relação a vários aspectos de aplicação, principalmente quanto à produtividade agrícola e biorremediação. Possuem também características como suprimirem patógenos de solo (WELLER, 1988); possuírem o solo como habitat natural, mais especificamente, partículas de matéria orgânica e rizosfera (ROVIRA & SANDS, 1971); serem de ocorrência natural, apresentando-se em elevadas populações (KLOEPPER *et al.*, 1980a; SUSLOW & SCHROTH, 1982b; XU & GROSS, 1986); serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer em uma grande variedade de condições ambientais (SCHROTH & HANCOCK, 1982). Além destas vantagens, são capazes de produzir uma grande variedade de antibióticos (LEISINGER & MARGRAFF, 1979) e de sideróforos (KLOEPPER *et al.*, 1980b; MISAGHI *et al.*, 1982), que atuam inibindo bactérias e fungos fitopatogênicos.

## 5. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias

Estudos da microbiota da rizosfera permitiram a identificação de processos fisiológicos específicos, como, por exemplo, a fixação de nitrogênio por bactérias que beneficiam a planta (KLOEPPER *et al.*, 1989).

Bactérias como *A. chroococum* e *Azospirillum* fixam nitrogênio atmosférico e podem promover o crescimento de plantas, embora o mecanismo aceito como responsável por este efeito não seja apenas a fixação de nitrogênio (BROWN, 1974).

Outro mecanismo sugerido para a promoção de crescimento de plantas por bactérias benéficas é a mineralização de componentes orgânicos fosfatados, ou a solubilização dos componentes inorgânicos de fósforo (KLOEPPER *et al.*, 1989). Rizobactérias podem aumentar a disponibilidade de fósforo às plantas, ou por solubilização de fosfato orgânico via a ação de fosfatase ou por solubilização de fosfato inorgânico com ácidos orgânicos. Algumas rizobactérias como *Bacillus megaterium* e *P. fluorescens* têm mostrado, sob diversas condições ambientais, seu potencial quanto ao aumento na disponibilidade de fósforo às plantas.

Além do fósforo e do nitrogênio, a bacterização também tem proporcionado o aumento de outros nutrientes nas plantas, como o boro e o potássio.

O mecanismo mais comumente aventado para explicar os vários efeitos das rizobactérias sobre as plantas é a produção de fitohormônios, incluindo entre eles auxina e giberelina. Estas substâncias são produzidas por alguns microrganismos do solo em resposta ao metabolismo de exsudados específicos das raízes (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1991). Auxinas são uma classe de hormônios vegetal, sendo o mais bem caracterizado o ácido indol-acético (AIA) que é conhecido por aumentar a alongação e a diferenciação celular.

Beyeler *et al.* (1997) determinaram o efeito da superprodução de AIA por uma linhagem de *P. fluorescens* sobre o crescimento vegetal. Uma linhagem mutante, obtida a partir da linhagem selvagem de *P. fluorescens* (CHAO), que produzia quantidades superiores de AIA, foi construída. Este mutante provou ser deletéria ao crescimento de trigo e pepino cultivados em solo esterilizado. Já em solo não autoclavado, esta linhagem não causou efeitos negativos, mas melhorou significativamente o crescimento de pepino.

Recentemente foi descoberta em RPCPs a presença da enzima aminociclopropano-carboxilato (ACC) desaminase (JACOBSON *et al.*, 1994; GLICK *et al.*, 1994, 1995). A função dessa enzima é hidrolisar ACC, que é uma substância precursora do etileno, sintetizado nos tecidos de plantas (YUNG *et al.*, 1982). A presença dessa enzima estimula o crescimento da planta e o alongamento da raiz devido ao seqüestramento e hidrólise do ACC a partir de sementes germinadas, conseqüentemente, reduzindo o nível de etileno nas plantas (GLICK *et al.*, 1994, 1995). Essa hipótese foi comprovada pela utilização de três mutantes de *P. putida* sem atividade de ACC desaminase. Estes não foram capazes de hidrolisar o ACC e a planta produziu etileno. Foram ainda incapazes de promover o alongamento de raízes de canola em condições gnotobióticas, diferindo do tipo selvagem (LIFSHITZ *et al.*, 1987; GLICK *et al.*, 1994, 1995).

Além de mecanismos diretos, as RPCPs são capazes de promover o crescimento de plantas pela supressão de microrganismos prejudiciais, ocasionando uma mudança na composição da microbiota da rizosfera ou uma substituição ou exclusão desses componentes (SCHROTH & HANCOCK, 1981; SCHROTH & HANCOCK, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1982a).



Sabe-se que os modos de ação para a supressão de patógenos por RPCPs devem-se à competição por nutrientes (p.ex. carbono, nitrogênio e íon férrico), antibiose e indução de resistência (WELLER, 1988; LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1993). Entretanto, a competição por ferro é relatada como responsável pela inibição do crescimento, ou mesmo a exclusão de patógenos e microrganismos deletérios no solo. Essa competição ocorre nos solos em que o elemento ferro encontra-se em condições limitantes, o que é geralmente observado em solos com pH neutro ou alcalino. Nessas condições, microrganismos e plantas dependem de agentes quelantes para solubilizar e transportar o ferro inorgânico (LUCON, 2000).

A produção de componentes tóxicos por RPCPs como antibióticos e HCN (hidrogênio cianida), ativos contra rizobactérias deletérias, também tem sido proposta como um mecanismo de promoção de crescimento (WELLER, 1988).

## 6. Colonização de raízes por rizobactérias

A capacidade das RPCPs de colonizarem o sistema radicular é de fundamental importância para o seu efetivo estabelecimento na rizosfera e atuação como um agente ativo em processos de biodegradação de pesticidas. A colonização compreende uma série de passos: migração de células bacterianas em direção às raízes, ataque, distribuição ao longo das raízes, crescimento e estabelecimento da população. Após o contato inicial, vem a fase crucial que é a manutenção ou persistência, onde a bactéria utiliza exsudados das raízes para se multiplicar e sobreviver.

Quimiotactismo tem sido demonstrado em muitas bactérias associa-das, particularmente linhagens de *Pseudomonas*, que migram ativamente em direção às sementes.

A dispersão de rizobactérias ao longo das raízes em crescimento é controlada pela motilidade e movimento passivo de bactérias (fluxo de água). Quimiotaxia em direção aos exsudados e motilidade ativa parecem prevalecer sobre o movimento passivo.

Para explicar o fenômeno de colonização de raízes por rizobactérias, tem sido proposto o uso de mutantes de *Pseudomonas putida* negativos ( $\text{Agg}^-$ ) para aglutinação às raízes (ANDERSON *et al.*, 1988; TARI & ANDERSON, 1988). Comparados à linhagem selvagem, os mutantes  $\text{Agg}^-$  aderiram-se às raízes em menor extensão, colonizando-as moderadamente e levando a uma menor proteção de plantas de pepino ao ataque de *Fusarium oxysporum*.

Com relação à motilidade, Howie *et al.* (1987) e Scher *et al.* (1988) constataram que mutantes imóveis colonizaram as raízes de forma semelhante às linhagens selvagens, de onde se concluiu que a motilidade não é requerida nesse processo. Já de Weger *et al.* (1987) observaram que um mutante não-móvel de *Pseudomonas* spp. foi incapaz de colonizar as regiões inferiores das raízes de batata quando comparado com a linhagem parental.

Moléculas de polissacarídeos da superfície celular de *Agrobacterium* e *Rhizobium* mediam seu ataque e subsequente interação com células de plantas (HALVERSON & STACEY, 1986). As linhagens de *Pseudomonas* WCS 358 e

WCS 374 apresentaram polissacarídeos com longas cadeias laterais de O-antigênico. Destas linhagens, de Weger *et al.* (1987) construíram mutantes que não produziam as cadeias laterais de O-antigênico e que não diferiram das linhagens selvagens com relação ao ataque a partículas de sefadex ou raízes esterilizadas de batata. Estes achados conflitantes sobre o papel dos flagelos podem ser atribuídos a possíveis diferenças nos isolados bacterianos, na espécie de planta e nas condições físicas do solo, particularmente a umidade. Outros fatores não inerentes à bactéria podem facilitar ou não a colonização de raízes; dentre estes, pode-se mencionar o potencial matricial, embora a bactéria introduzida possa se difundir a partir do material semeado para as raízes numa ampla faixa de potencial osmótico (WELLER, 1988).

De acordo com alguns estudos, as maiores populações de bactérias ocorrem em pressões na faixa de -0,3 a 0,7 bar, na qual Howie *et al.* (1987) observaram que a disponibilidade de oxigênio e o potencial de turgor das células e/ou a disponibilidade de nutriente seriam adequados para o desenvolvimento de células bacterianas. A área de percolação pode servir também para estender a população bacteriana introduzida na direção das extremidades das raízes.

O pH e a temperatura são também fatores importantes na colonização. Para o crescimento *in vitro* de linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida*, a temperatura seria de 25-30°C, e o pH de neutro a alcalino. No solo, porém, a colonização é favorecida nas temperaturas de 12 a 18°C e em pH de 6,0 a 6,5. Isso ocorre porque temperatura e pH abaixo do ideal refletem uma menor competição com a microbiota indígena.

A colonização de raízes, portanto, diz respeito ao crescimento da bactéria ao longo das raízes. Essa característica é pré-requisito primário na rizosfera, onde a colonização de novas superfícies radiculares formadas é realizada pela migração da microflora existente ou pelo inóculo do solo.

## 7. Biodegradação de xenobióticos por rizobactérias

Plantas usadas para fitorremediação (ver capítulo 25) deveriam ser capazes de acumular altas quantidades do contaminante e também de produzir um grande volume de biomassa. Contudo, muito freqüentemente, plantas podem ser comprometidas por se desenvolverem em solos contaminados devido à toxicidade inerente do poluente. Assim, a inoculação de RPCP pode auxiliar o crescimento dessas plantas. A sobrevivência e estabelecimento de RPCP são essenciais para uso em fitorremediação. No entanto, tem sido comprovado que altos níveis de contaminantes podem ter efeitos inibitórios ao crescimento de RPCP. Por exemplo, o crescimento de *Enterobacter cloacae* CAL2 foi inibido em 50% em solos contaminados com 20 mM de arsenato (NIE *et al.*, 2002). Está também provado que algumas bactérias são sensíveis a um contaminante, mas não a outro. É o caso de *Flavobacterium* sp. que é muito sensível a cádmium, mas não a chumbo (BELIMOV *et al.*, 1998). Na prática, é essencial que bactérias usadas em biorremediação sejam resistentes aos níveis dos contaminantes endógenos do ambiente a ser descontaminado.

No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que os exsudados radiculares são estimulados na presença de xenobióticos. Em cultivos hidropônicos de milho, a presença do herbicida simazina, causou um aumento na exsudação de ácidos orgânicos (KEIPER & REBER, 1970). Quando microrganismos foram introduzidos à solução nutritiva, o herbicida aumentou o peso e comprimento das raízes de milho. Os autores desse estudo não explicam o fenômeno sobre o aumento da exsudação, mas especulam que pode ser uma resposta da planta ao ataque e nourish mais microrganismos ou pode ser simplesmente um efeito fisiológico do composto químico sobre a planta.

A maioria dos herbicidas usados para controlar ervas daninhas são prontamente metabolizados por plantas não-alvo. Por sua vez, as bactérias da rizosfera podem exercer um papel fundamental quanto à proteção da planta contra os efeitos tóxicos dos poluentes. Isso tem sido recentemente comprovado em pesquisas envolvendo alguns xenobióticos. Herring & Berring, (1988) verificaram que os efeitos tóxicos de ésteres fitalato sobre plântulas de espinafre e ervilha foram sendo abolidos pela presença de microrganismos do solo. Os estudos de Kruger *et al.* (1997) também mostraram que três linhagens de microrganismos capazes de degradar dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) poderiam ser usadas para reduzir a atividade desse produto na rizosfera de ervilha.

Em um estudo similar, Roque (2000) mostrou que uma rizobactéria, *Acinetobacter baumannii*, envolvida na degradação do herbicida diuron protege plântulas de milho dos efeitos tóxicos desse herbicida em solos contaminados. De fato, a biodegradação de certos herbicidas é acelerada na rizosfera de plantas que são relativamente insensíveis aos efeitos herbicidas do composto químico. Nesse sentido, Sandmann & Loos 1984 constataram um aumento no número de microrganismos envolvidos na degradação de 2,4-D na rizosfera de cana-de-açúcar comparados com cravo africano. Os autores sugeriram que o aumento no número dos degradadores foi o possível mecanismo de proteção da cana-de-açúcar dos efeitos de 2,4-D e que análogos fenólicos nos exsudados selecionaram microrganismos responsáveis pela degradação de 2,4-D.

Os efeitos de 3-cloro e 4-clorobenzoato (3-CBA, 4-CBA) sobre a germinação de sementes de berinjela e tomate foram estudados por Ajithkumar *et al.* (1998). Estas plantas foram altamente sensíveis a 200 mg L<sup>-1</sup> de 3-CBA e 4-CBA e mostraram redução drástica na germinação de sementes e vigor de plântulas. Na concentração de 400 µg L<sup>-1</sup> a germinação de sementes de tomate foi completamente inibida. Por outro lado, quando solo contaminado com 3-CBA e 4-CBA foi tratado com *P. aeruginosa* 3mT, envolvida na degradação de clorobenzoato, houve uma proteção completa de sementes e plântulas de tomate.

O grau de degradação de xenobióticos em solos rizosféricos parece relacionar-se com as espécies de plantas envolvidas, pois estas variam em morfologia, metabólitos e interações ecológicas com outros organismos. Espécies de plantas determinam a composição da rizosfera. Lemanceau *et al.* (1995) mostraram a influência de espécies de linho e de tomate sobre a diversidade de pseudomonas fluorescentes. A diversidade de isolados de *Pseudomonas* do solo, determinada pela oxidação de 147 compostos orgânicos e por “fingerprinting” PCR (REP-PCR) foi diferente da diversidade obtida com isoladas da rizosfera dessas duas espécies de plantas. A capacidade de linhagens de *Pseudomonas* em metabolizar compostos presentes nos exsudados radiculares

deveria dar uma vantagem competitiva sobre as bactérias do solo sem esta habilidade. Assim, a ação seletiva dessas plantas poderia ser causada pelos exsudados específicos que elas produzem. As espécies vegetais ou tipo botânico (monocotiledôneas, dicotiledôneas, halófitas, leguminosas etc) determinaram os parâmetros que são significantes em termos de degradação na rizosfera (SHANN & BOYLE, 1994). É, pois, sugerido que exsudados radiculares podem influenciar a biodegradação, alterando diretamente a comunidade microbiana.

## 8. Rizadorremediação

Para entender a eficácia das tecnologias de biorremediação, tanto *ex situ* como *in situ*, é necessário o conhecimento sobre a cinética da biodegradação. Estudos em laboratório visando determinar as taxas de biodegradação podem ser usados como testes de varredura para determinar a rapidez e extensão da biorremediação, fornecendo, assim, um desenho criterioso na obtenção de uma biorremediação ótima. No entanto, nem todos os ensaios de laboratório sobre biodegradabilidade podem ser usados para simular os complexos processos de biorremediação em condições naturais de campo. Os parâmetros mais importantes a serem avaliados antes da implementação de um projeto nessa área são determinar se o composto é biodegradável e conhecer o mecanismo mais efetivo e a taxa de biodegradação.

A seleção da estratégia mais efetiva de biorremediação está baseada nas características dos contaminantes (solubilidade, lipofilicidade, estrutura molecular, volatilidade, peso específico e susceptibilidade ao ataque microbiano) e da área contaminada. Além disso, outros fatores também interferem no sucesso da biorremediação como, por exemplo, comunidade microbiana nativa, aeração, suplementação nutricional, potencial de água, dentre outros. Compostos que são mais susceptíveis ao metabolismo microbiano apresentam estruturas moleculares simples, são solúveis em água, não são tóxicos e servem como substratos para o crescimento aeróbio de microrganismos. Ao contrário, compostos que são resistentes ao metabolismo microbiano exibem estruturas moleculares complexas, apresentam baixa solubilidade, forte sorção, toxicidade e não suportam o crescimento microbiano.

A complexidade das técnicas de biorremediação requer que cada tratamento seja adaptado à situação individual do local contaminado. Todo planejamento de biorremediação deve começar por definir os parâmetros de tratamento. No entanto, mesmo tendo sido levantados esses parâmetros, não é uma tarefa fácil o delineamento experimental e o início dos trabalhos. Os parâmetros mais importantes são: concentração e lista de contaminantes a serem removidos e propriedades físico/químicas (volatilidade, solubilidade, gravidade específica, coeficiente de partição octanol/água). Deve ser lembrado que os ensaios laboratoriais, sob condições controladas, devem ser usados para predizer o que acontecerá em condições naturais.

Outras características de importância devem ser avaliadas em um planejamento de biorremediação, para garantir o sucesso do tratamento. Skladany & Metting Junior (1992), apontam alguns desafios para o sucesso do tratamento biológico de solos contaminados:

- **Heterogeneidade do resíduo:** resíduos orgânicos e inorgânicos são heterogeneamente dispersos no solo. Os contaminantes podem estar presentes na forma de sólidos, líquidos ou gases, livres na solução do solo ou fisicamente sorvidos ou quimicamente ligados à partícula.
- **Efeitos de concentração:** os contaminantes podem estar presentes em concentrações extremamente baixas (ppm ou ppb), ou em concentrações muito altas. Baixas concentrações podem não ser adequadas para suportar o crescimento microbiano. Altas concentrações, por outro lado, podem ser inibitórias ou tóxicas à vida microbiana.
- **Persistência ou toxicidade:** muitos contaminantes são relativamente resistentes à biodegradação ou podem requerer esforços metabólicos combinados de várias espécies microbianas, com ou sem a presença adicional de fontes de carbono.
- **Condições adequadas para o crescimento microbiano:** a atividade microbiana adequada terá lugar somente sob condições ambientais favoráveis. Criar e manter essas condições ótimas é uma tarefa difícil e desafiadora. Condições específicas da área contaminada podem limitar severamente a capacidade para se criar condições aceitáveis para o crescimento microbiano, particularmente para aplicações *in situ*.

Entre os muitos métodos de biorremediação disponíveis, alguns podem ser empregados para tratamento de grandes extensões de solos agrícolas contaminados. O nível de contaminação, para que haja intervenção, pode ser simplesmente aqueles onde os níveis de resíduos presentes afetam o desenvolvimento de outras culturas agrícolas susceptíveis, ou que estejam além dos níveis aceitáveis. Dentro dessa abordagem, a fitorremediação e a utilização de rizobactérias aparecem como alternativas mais práticas.

Um grande número de pesquisas tem evidenciado um aumento na degradação de pesticidas na rizosfera de uma variedade de espécies vegetais (Tabela 1). Mais recentemente, essas pesquisas têm se voltado para compostos químicos industriais, como HAPs, petróleo, surfactantes, PCP etc.

O sistema “rizosfera” é uma tecnologia apropriada para contaminantes dispersos próximos à superfície do solo. O sistema radicular servindo, portanto, como um meio para efetiva colonização do solo, assim como uma fonte prontamente disponível de nutrientes. A rizosfera é particularmente atrativa quando a capacidade metabólica de interesse é restrita a certas bactérias, como no caso da degradação cometabólica de tricloroetileno (TCE) (WALTON & ANDERSON, 1990). TCE está presente em 27,9% dos sítios com resíduos tóxicos nos USA, sendo considerado um dos 10 poluentes mais comuns detectados nessas áreas ([www.hsia.org/trichloro.htm](http://www.hsia.org/trichloro.htm)). Esse mesmo poluente foi removido do solo por meio de uso de uma rizobactéria, *Pseudomonas fluorescens* associada às raízes de trigo. Essa bactéria expressa, portanto, os genes *tomA*<sup>+</sup> (tolueno o-monoxigenase) de *Burkholderia cepacia* PR1<sub>23</sub> (TOM--<sub>23</sub>) envolvidos na degradação de TCE (YEE *et al.*, 1998). Embora rizobactérias indígenas e plantas sejam empregadas para tratar solos contaminados, bactérias capazes de colonizar plantas específicas podem ser transformadas geneticamente para

TABELA 1. Exemplificação de trabalhos mostrando aumento da degradação de pesticidas na rizosfera.

Xenobióticos	Planta	Referências
Atrazina	Milho	Hueck & Seibert (1981)
Atrazina		
Metolachlor	Kochia	Anderson <i>et al.</i> , (1994)
Tritlesalina		
Atrazina	Milho	Piretti <i>et al.</i> , (2002)
Atrazina	Milho	Alvey & Crowley (1996)
Mecoprop, 2,4D	Trigo	Lappin <i>et al.</i> , (1985)
Mecoprop, 2,4D	Cana-de-açúcar, trevo	Sandmann & Loos (1984)
Diazinon, paraton	Feijão	Hsu & Bartha (1979)
Tricloroetileno	Trigo	Yee <i>et al.</i> , 1998
Paration	Arroz	Reddy & Sethumathan (1983)
Hidrocarbonetos poliaromáticos (benzo[a]pireno, benzo[a]anthraceno, criseno e dibenzo[a,h] antraceno)	Gramíneas	Aprill & Sims (1990)
Propanil	Arroz	Hoagland <i>et al.</i> , (1994)
Surfactantes	Milho, soja	Knaebel & Vestal (1992)
Pentaclorofenol	Gramínea ( <i>Agropyron desortorum</i> )	Ferro <i>et al.</i> , (1994)
Petróleo	Leguminosas	Gudin (1978)

melhor controle do processo. Uma linhagem de *P. fluorescens* colonizadora de raízes foi construída por integração cromossomal dos genes *bph* (codificando a degradação de PCB) com um vetor de integração suicida (BRAZIL *et al.*, 1995).

A degradação de PCB com esta bactéria recombinante foi demonstrada em microcosmos contendo planta-solo-bactéria, usando um gene repórter inserido próximo aos genes envolvidos na degradação de PCB. Esse sistema foi eficaz em remover 63% de TCE após 4 dias, demonstrando a possibilidade da rizorremediação para o tratamento de solos superficiais contaminados com TCE. Uma diferente linhagem de *P. fluorescens* capaz de colonizar raízes de feijão foi também construída.

A bactéria recombinante, quando aplicada à rizosfera de feijão foi capaz de degradar 2,5-diclorobenzoato, utilizando-o com fonte de carbono (CROWLEY *et al.*, 1996).

Vários estudos sob condições controladas têm mostrado a influência de plantas sobre a biodegradação acelerada na rizosfera. A adição de uma linhagem de *P. fluorescens* capaz de degradar 2,5-diclorobenzoato causou o desaparecimento desse composto em 3 dias na presença de plantas de feijão, visto que quantidades consideráveis do poluente ainda permaneciam no solo sem plantas (CROWLEY *et al.*, 1996).

Estudos feitos com atrazina, mostraram que as taxas de mineralização desse herbicida foi significativamente superior na rizosfera de milho do que em solo sem vegetação (PIUTTI *et al.*, 2002). A rizosfera do milho também mostrou um aumento da biomassa de C microbiana. Análise do gene *atzC*, que codifica uma enzima envolvida na mineralização de atrazina, conduzida por PCR, revelou sua presença em um nível superior na rizosfera do que no solo não vegetado. Estes resultados sugeriram que a estimulação da mineralização de atrazina na rizosfera depende da abundância das comunidades microbianas.

Do mesmo modo como a presença de vegetação pode aumentar a degradação de pesticidas, ela também pode aumentar a velocidade de degradação de compostos recalcitrantes, como, por exemplo, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA). Pesquisas comprovando esses efeitos têm sido publicadas mais recentemente, mostrando o potencial da rizorremediação de vários compostos químicos industriais. Em um experimento em condições controladas sob casa-de-vegetação foi verificado que a degradação de HPA foi maior na presença de plantas do que na sua ausência (SCHWAB *et al.*, 1995). HPAs alvo foram detectáveis nos tecidos da planta, mas a quantidade total de absorção foi insignificante. A maior atividade microbiana detectada foi aparentemente responsável pela dissipação aumentada dos HPAs.

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas podem também conter altos níveis de metais pesados. A hiperacumulação de metais (até 1% do peso seco) é comum para plantas que têm se adaptado a solos com alta concentração de Co, Cu, Cr, Pb, Ni e Zn (BAKER e BROOKS, 1989). Há bactérias isoladas da rizosfera, no entanto, que degradam xenobióticos e/ou bioacumulam metais, mas não necessariamente são consideradas RPCP. Neste caso, raízes de plantas atuam como sítios para transformação do contaminante pelas rizobactérias (ANDERSON *et al.*, 1993). *Kluyvera ascorbata* (SUD165), por exemplo, uma rizobactéria, foi resistente aos efeitos tóxicos de  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $CrO_4^-$ . Esta bactéria, quando inoculada em sementes de canola e plantada sob altas concentrações de cloreto de níquel, protegeu parcialmente a planta contra a toxicidade (BURD *et al.*, 1998).

Segundo os autores, a bactéria não teve nenhuma influência mensurável sobre a quantidade de níquel acumulada nas plantas de canola. Entretanto, o efeito sobre a promoção de crescimento da planta na presença do metal foi, provavelmente, não atribuído à redução da absorção do níquel pelas plântulas, mas sim, à habilidade da bactéria de baixar o nível de estresse de etileno induzido pelo níquel.

As propriedades da planta que são melhoradas com a inoculação RPCPs durante a biorremediação incluem biomassa, absorção do contaminante e nutrição e saúde da planta.

Algumas plantas acumulam mais contaminantes por grama de material vegetal com a adição de RPCRs, conforme verificado por Hoflich & Metz (1997) e por Whiting *et al.* (2001). Esses estudiosos mostraram que a inoculação bacteriana de milho e *Thlaspi caerulescens* aumentou a absorção de metais pesados por essas plantas. Do mesmo modo que os autores acima, de Souza *et al.* (1999) também encontraram um aumento na acumulação de selenium por *Brassica juncea* após inoculação com rizobactérias.

O sucesso da aplicação de RPCPs para biorremediação dependerá da sobrevivência e estabilidade da bactéria em solos com altos níveis de contaminação. Nessas condições, a bactéria pode ser completamente inibida. Um exemplo que ilustra bem esse efeito é a inibição do crescimento de, aproximadamente, 50% de *Enterobacter cloacae* em solos contaminados com 20 mM de arsenato. Já em solos com somente 2mM arsenato, a bactéria foi inibida em 2% (NIE *et al.*, 2002).

## Referências

- AJITHKUMAR, P.V.; GANGADHARA, K.P.; MANILAL, P.; KUNHI, A.A.M. Soil inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* 3mT eliminates the inhibitory effect of 3-chloro and 4-chlorobenzoate on tomato seed germination. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.8/9, p.1053-1059, 1998.
- ANDERSON T.A.; GUTHRIE E.A.; WALTON B.T. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. **Environmental Science and Technology**, v.27, p.2630-2636, 1993.
- ANDERSON, A.J.; P. HABIBZADEGAH-Tari; C.S. TEPPER. Molecular studies on the role of root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.375-380, 1988.
- ANDERSON, T.A.; KRUGER, E.L.; COATS, J.R. Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. **Chemosphere**, v.28, p.1551-1557, 1994.
- ARSHAD, M.Y.; FRANKENBERGER, W.T.Jr. Microbial production of plant hormones. **Plant and Soil**, v.133, p.1-8, 1991.
- BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.
- BARBER, D.A.; MARTIN, J.K. The release of organic substances by cereal roots into soil. **New Phytologist**, v.76, p.69-80, 1976.
- BELIMOV A.A.; KUNAKOVA A.M.; VASILYEVA N.D.; KOVATCHEVA T.S.; DRITCHKO V.F.; KUZOVATOV S.N.; TRUSHKINA I.R.; ALEKSEYEV Y.V. Accumulation of radionuclides by associative bacteria and the uptake of <sup>137</sup>Cs by the inoculated barley plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**, v.79, p.275-280, 1998.
- BELIMOV, A.A.; DIETZ, K.J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. **Microbiology Research**, v.155, p.113-121, 2000.
- BEYELER M.; MICHAUX, P.; KEEL, C.; HAAS, D. Effect of enhanced production of indol-3-acetic acid by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant growth. In: Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) **Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**, Sapporo, Japan, October 18-22, 1997, Sapporo University, pp 310-312
- BRAZIL, G.M.; KENEFICK, L.; CALLANAN, M.; HARO, A.; V. de LORENZO; DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1946-1952, 1995.
- BROWN M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.181-197, 1974.
- BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.35, p.443-445, 1972
- BROWN, M.E.; JACKSON, R.M.; BURLINGHAM, S.K. Studies on *Azotobacter* species in soil. II. Effects of artificial inoculation on crops yields. **Plant and Soil** Dordrecht, v.17, n.3, p.320-332, 1962.
- BROWN, M.E.; JACKSON, R.M.; BURLINGHAM, S.K. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Populations of *Azotobacter* in the rhizosphere and effects of artificial inoculation. **Plant and Soil**, v.20, n.2, p.194-214, 1964.
- BURD G.I.; DIXON D.G.; GLICK B.R. A plant-growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3663-3668, 1998.
- CHRISTENSEM, C.M. **Storage of cereal grains and their products**. Saint Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1974. 568 p.
- CHRISTENSEN, B.E. The role of extracellular polysaccharide in biofilms. **Journal of Biotechnology**, v.10, p.181-202, 1989.



- CROWLEY, D.E.; M.V. BRENNEROVA; C. IRWIN; V. BRENNER; D.D. FOCHT. Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.20, p.79-89, 1996.
- CURL E.A.; TRUELOVE B.. The rhizosphere. In: **Advances series in agricultural sciences** No. 15. Springer-Verlag, 1986. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- de SOUZA M.P.; CHU D.; ZHAO M.; ZAYED A.M.; RUZIN S.E. *et al.* Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. **Plant Physiology**, v.119, p.565-73, 1999.
- de WEGER, L.A.; van der VLUGT, C.I.M.; WIJFJES, A.H.M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B.; LUGTENBERG, B.J.J. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.2769-2773, 1987.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.
- GLICK, B.R.; JACOBSON, C.B.; SCHWARZE, M.M.K.; PASTERNAK, J.J. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.911-915, 1994.
- HALE, M.G.; L.D. MOORE; G.J. GRIFFIN. Root exudates and exudation, p. 163-203. In Y. R. DOMMERGUES; S.V. KRUPA (ed.), **Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants**. Amsterdam: Elsevier, 1978.
- HALVERSON, L.J.; STACEY, G. Effect of lectin on nodulation of wild type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation defective mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.753-760, 1986.
- HILTNER, L. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft**, v.98, p. 59- 78, 1904.
- HOFLICH G.; METZ R. Interactions of plant-microorganism-associations in heavy metal containing soils from sewage farms. **Bodenkultur**, v.48, p.239-247, 1997.
- HOWIE W.J.; COOK R.J.; WELLER D.M. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. **Phytopathology**, v.77, p.286-292, 1987.
- JACOBSON, C.B.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.1019-1025, 1994.
- JIMENEZ, J.I.; MINAMBRES, B.; GARCIA, J.L.; DIAZ, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v.4, p.824-841, 2002.
- KATZNELSON, H.; COLEM, S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal of Microbiology**, v.11, p.733-741, 1965.
- KLOEPFER J.W.; LIFSHITZ R.; ZABLOTOWICZ R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-43, 1989.
- KLOEPFER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980a.
- KLOEPFER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Current Microbiology**, v.4, p.317-320, 1980b.
- KLOEPFER, J.W. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato root and daughter tubers. **Phytopathology**, v.73, p.217-219, 1983.
- KRUGER E.L.; RICE P.J.; ANHALT J.C.; ANDERSON T.A.; COATS J.R. (1997) "Comparative fates of atrazine and deethylatrazine in sterile and nonsterile soils". **Journal of Environmental Quality**, v.26, p.95-101, 1997.
- LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. **Microbiological Reviews**, v.43, p.422-442, 1979.
- LEMANCEAU P.; ALABOUVETTE C.. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. **Biocontrol Science and Technology**, v.3, p.219-234, 1993.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.; ALABOUVETE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborn populations of fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.11004-1012, 1995.
- LEWIS D.G.; QUIRK J.P. Phosphate diffusion in soil and uptake by plants. **Plant and Soil**, v.26, p.445-453, 1967.

- LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; TIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rape-seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnoto-tropic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.390-395, 1987.
- LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**, Jaguariúna – Embrapa Meio Ambiente, v.3, cap.6, p.141-161, 2000.
- MISAGHI, I.J.; STOWELL, L.J.; GROGAN, R.G.; SPEARMAN, L.C. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v.72, p.33-36, 1982.
- NELSON, K.E. *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v.4, p.799-808, 2002.
- NIE, L.; SHAH, S.; RASHID, A.; BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.355-361, 2002.
- PIUTTI, S.; HALLET, S.; ROUSSEAU, S.; PHILIPPOT, L.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Accelerated mineralization of atrazine in maize rhizosphere soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.434-441, 2002.
- ROQUE, M.R.A. **Isolamento, Caracterização e Ecologia de *Acinetobacter baumannii* Degradora de Herbicida Diuron**. Rio Claro: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2000. 119f. Tese (Doutorado).
- ROVIRA, A.D. Microbial inoculation of plants. Establishment of free-living  $N_2$ -fixing bacteria on maize and wheat. **Plant and Soil**, v.19, p.304-314, 1963.
- ROVIRA, A.D. Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. **Soils and Fertilizers** v.25, p.167-172, 1962.
- ROVIRA, A.D.; FOSTER, R.C.; MARTIN, J.R. Note on Terminology: Origin, Nature, and Nomenclature of Organic Materials in the Rhizosphere. In: **The Soil-Root Interface**. 1979, Academic Press, New York.
- ROVIRA, A.D.; SANDS, D.C. Fluorescent pseudomonads: A residual component in the soil microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, p.253-259, 1971.
- SANDMANN, E.R.I.C.; LOOS, M.A. Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media: high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Chemosphere**, v.13, p.1073-1084, 1984.
- SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.; ZALESKI, I.; LALIBERTE, M. Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacteria motility, chemotaxis and generation time. **Phytopathology**, v.78, p.1055-1059, 1988.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.R.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.339-358, 1987.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Select topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.35, p.453-476, 1981.
- SCHWAB, A.P.; BANKS, M.K.; ARUNACHALAM, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soils, p.23-29. In: HINCHEE, R.E.; ANDERSON, D.B.; HOEPEL, R.E. (Ed.). **Bioremediation of recalcitrant organics**. Columbus: Battelle Memorial Institute, 1995.
- SHANN, J.R.; BOYLE, J.J. Influence of the plant species on *in situ* rhizosphere degradation. In: **Bioremediation through Rhizosphere Technology**. ANDERSON, T.; COATS, J. (Ed.). Washington, DC: ACS, 1994.
- SKLADANY, G.J.; METTING JUNIOR, F.B. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING JUNIOR, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: M. Dekker, 1992. p.483-513.
- SMILEY, R.W. Rhizosphere pH as influenced by plants, soils, and nitrogen fertilizers. **Soil Science Society of America Journal**, v.38, p.795-799, 1974.
- 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, 1982b.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, v.72, p.111-115, 1982a.
- TARI, P.H.; ANDERSON, A.J. *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2037-2041, 1988.
- VANCURA, V.; STANEK, M. Root exudates of plants. V. Kinetics of exudates from bean roots as related to the presence of reserve compounds in cotyledons. **Plant and Soil**, v.43, p. 547-559, 1975.

- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1012-1016, 1990.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere; potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**, p.1012-1016, 1991.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.
- WHITING, S.N.; LEAKE, J.R.; MCGRATH, S.P.; BAKER, A.J.M. Assessment of Zn mobilization in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* by bioassay with non-accumulator plants and soil extraction. **Plant and Soil**, v.237, p.147-156, 2001.
- XU G.W.; GROSS D.C. Field evaluations of the interactions among fluorescent *Pseudomonads*, *Erwinia carotovora*, and potato yields. **Phytopathology**, v.76, p.423-430., 1986.
- YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD, T.K. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monoxygenase constitutively. **Applied and Environmental Microbiology**, p.112-118, 1998.
- YUNG K.H.; S.F. YANG; F. SCHLENK. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in plant tissue. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.104, p.771-777, 1982.