



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ADRIANA KNOB

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NA RIZOSFERA DE ESPÉCIES
LEGUMINOSAS NATIVAS MEDIADAS POR
RIZOBACTÉRIAS E MICORRIZAS ARBUSCULARES**

Londrina
2005

ADRIANA KNOB

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NA RIZOSFERA DE ESPÉCIES
LEGUMINOSAS NATIVAS MEDIADAS POR RIZOBACTÉRIAS E
MICORRIZAS ARBUSCULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina

2005

Todas as coisas tem seu tempo e sua hora... e se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes. Este trabalho é dedicado a meus pais, Inacio e Regina, pela lição de amor que me ensinaram durante toda a minha vida. Dedico amorosamente também a meus queridos irmãos Andréia, Jean e André.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, orientador e amigo, pela atitude segura, por “ter acreditado” e especialmente pela orientação sempre valiosa, atenção e carinho sempre constantes;

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, por ter me acolhido tão calorosamente em seu laboratório;

À colega de mestrado Gisele Milani Lovato, por sua generosidade em fornecer-me as amostras de solo para que este trabalho pudesse ser realizado;

Ao técnico de laboratório Márcio Cruz, por todo auxílio, por sua amizade e companhia sempre aprazível;

Aos amigos de laboratório, não são apenas colegas! Pude construir verdadeiras amizades, as quais recordarei sempre com muito carinho! Meu especial agradecimento por todos os momentos valiosos que passei na companhia de vocês!

Um carinho especial ao Tiago, por toda ajuda, força e carinho inestimáveis, que foram dispensados durante toda a realização deste trabalho, especialmente nas horas mais difíceis.

Especialmente a Deus, que através de sua mão abençoada, deu-me forças para esta árdua caminhada, ajudando-me a vencer os obstáculos a mim propostos e iluminando todos os dias de minha vida!

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

*"O papel dos infinitamente pequenos
é infinitamente grande"*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 OS PROGRAMAS DE REFLORESTAMENTO	9
3.2 A RIZOSFERA.....	12
3.3 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	15
3.4 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	18
3.5 RIZOBACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO – <i>RHIZOBIUM</i> SPP.	19
3.6 UTILIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DE RIZOBACTÉRIAS (RPCP E RIZÓBIOS) NOS PROGRAMAS DE REFLORESTAMENTO.....	21
3.7 CARBOIDRATOS DO SOLO	24
3.8 ENZIMAS DO SOLO.....	26
REFERÊNCIAS	35
ARTIGO: Enzymatic activities in the rhizosphere of indigenous woody legume trees mediated by rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza.....	46

1 INTRODUÇÃO

A preocupação em se restaurar ecossistemas degradados é emergente. O reflorestamento com plantas nativas pode ser usado como alternativa visando restaurar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, bem como preservar a biodiversidade. Em um solo degradado, o sucesso do reflorestamento pode ser comprometido pela baixa disponibilidade de nutrientes e de matéria orgânica, o que acarreta efeitos adversos sobre propriedades físicas do solo, como a redução da capacidade de retenção e de infiltração de água, entre outros fatores. Nesses ambientes, o potencial de inóculo nativo de microrganismos benéficos às plantas é geralmente reduzido, sendo então necessário proceder à reinoculação com a finalidade de que estes auxiliem no seu estabelecimento. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são importantes nos processos de reflorestamento. Sua capacidade de estabelecer simbiose com plantas hospedeiras, geralmente as beneficia quanto à absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, além de aumentar a estabilização dos agregados do solo, o que o torna mais resistente à erosão. Os FMA também conferem às plantas proteção contra patógenos bem como favorecem o seu estabelecimento na presença de metais pesados.

Outros importantes microrganismos com potencial para uso nas estratégias de recuperação de áreas degradadas são as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Estas, por sua vez, podem atuar benéficamente por meio de diversas formas no hospedeiro, incluindo a disponibilização de nutrientes, produção de fito-hormônios e por conferir resistência a patógenos de plantas. Outras rizobactérias que podem auxiliar no estabelecimento das plantas são as bactérias fixadoras de nitrogênio. Uma vez estabelecida a simbiose com a planta hospedeira,

constituem uma importante fonte de nitrogênio para estes ecossistemas nutricionalmente pobres, o que pode contribuir para o estabelecimento de outras espécies vegetais.

As atividades enzimáticas no solo participam nos processos de decomposição dos materiais orgânicos bem como nas transformações inorgânicas, possuindo grande importância na fertilidade do solo, nas interações entre plantas, na eficiência do uso de fertilizantes e no estado de oxi-redução do solo. Envolvidas no ciclo dos nutrientes, tais como C, N e P, atuam na liberação das formas minerais desses nutrientes para as plantas e para os microrganismos. Suas atividades podem ser indicadoras da produtividade e da atividade microbiana. Além disso, são sensíveis à presença de poluentes, às práticas de manejo do solo bem como às alterações impostas por inóculos microbianos.

O efeito do uso de microrganismos benéficos em plantas pode ir além do seu efeito imediato sobre as mesmas, como, por exemplo, sobre o seu crescimento. Nesse caso, outras alterações podem ocorrer, como mudanças nas propriedades bioquímicas da rizosfera, a qual pode influenciar na disponibilidade de nutrientes. Sob esse aspecto, o uso de indicadores capazes de detectar precocemente essas mudanças pode contribuir para um melhor entendimento dos efeitos das associações microbianas sobre as plantas. Uma vez que integram informações a respeito do estado químico e biológico do solo, e sendo facilmente mensuradas, o estudo das atividades enzimáticas no solo pode ser uma ferramenta adicional para o entendimento das interações plantas-microrganismos.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de algumas enzimas e o conteúdo de carboidrato solúvel em água quente na rizosfera de quatro espécies leguminosas nativas, utilizadas nos programas de reflorestamento, quando associadas a quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OS PROGRAMAS DE REFLORESTAMENTO

A desertificação dos ecossistemas terrestres está comprometendo milhões de hectares anualmente (Warren et al., 1996). As áreas de floresta tropical têm diminuído progressivamente, para dar lugar a campos de agricultura, pastagens e a extensas áreas de terras degradadas, com grande perda de biodiversidade. O distúrbio das comunidades naturais de plantas é o primeiro sintoma visível, porém é freqüentemente acompanhado ou precedido pela degradação das propriedades físicas, químicas e/ou biológicas chaves do solo, relacionadas com a estrutura e disponibilidade de nutrientes para as plantas. Além disso, também ocorre a diminuição do teor de matéria orgânica, e/ou diversidade biológica e ainda processos mediados por microrganismos que promovem a disponibilização de nutrientes (Skujins & Allen, 1986). Essas propriedades são importantes para a manutenção da qualidade e da fertilidade do solo e, conseqüentemente, da sua capacidade em propiciar o estabelecimento e produtividade das plantas. Desta forma, a degradação do solo resulta na perda da sustentabilidade.

Devido ao aumento da necessidade da preservação ambiental, aliado ao avanço das leis que disciplinam a ação antrópica sobre as florestas de proteção, há crescente interesse em programas de revegetação de áreas degradadas, o que demanda conhecimentos técnico-científicos pelos potenciais executores desses programas (Macedo, 1993).

Um solo cujas propriedades físicas, químicas e biológicas estão deterioradas é um grande obstáculo para a regeneração natural da floresta e para os

programas de revegetação artificiais (Brow & Lugo, 1994). Os fragmentos remanescentes de floresta são muito importantes como reserva de germoplasma das espécies de plantas nativas. Onde a sucessão natural não pode ser estabelecida, devido à distância das fontes de propágulos, o plantio sustentável de árvores nativas pode ser uma alternativa promissora (Zangaro, 1997).

A restauração de ecossistemas degradados tem se tornado uma prática focada na manutenção e regeneração das comunidades nativas de plantas (Herrera et al., 1993). A utilização de espécies nativas para reflorestamento ou recomposição florística de áreas desmatadas é de grande importância para reduzir o impacto ambiental e conservar a biodiversidade.

De acordo com Ewel (1992), pode-se julgar o sucesso do restabelecimento de um ecossistema pela observação de cinco princípios básicos: *sustentabilidade*, que é a capacidade da nova comunidade de se perpetuar; *invasibilidade*, que é a susceptibilidade desta comunidade em ser invadida por espécies exógenas, constituindo-se este fato em sintoma de sub-utilização dos recursos água, luz e nutrientes; *produtividade*, que é função da eficiência de uso desses recursos pela comunidade de plantas; *retenção de nutrientes*, que é a capacidade da comunidade em não perder mais nutrientes do que a comunidade original anterior à degradação; e *interações bióticas*, que é a capacidade da comunidade de plantas em interagir com outros organismos. Embora a macro e a microbiota tendam a colonizar espontaneamente um ambiente, algumas espécies chaves são diretamente responsáveis pela integridade funcional de uma determinada comunidade vegetal, de modo que sua ausência pode comprometer a sustentabilidade.

Os processos de revegetação são, na maioria das vezes, onerosos, devido ao custo de produção e instalação das mudas. Esses custos são ainda maiores quando a área a ser revegetada é de baixa fertilidade natural, ou está degradada por processos erosivos ou empréstimo, ou ainda quando há necessidade de replantio das mudas devido a mortes ocorridas pelo estresse de transplântio. Nesses casos é preciso buscar alternativas economicamente viáveis a serem empregadas nas estratégias de revegetação (Carneiro et al., 1998).

O sucesso da revegetação depende da capacidade da plântula em capturar os recursos necessários no início do seu desenvolvimento, obter fonte contínua de nutrientes e possuir o vigor necessário para resistir a doenças e a estresses climáticos (Perry et al., 1987). O estabelecimento de uma cobertura vegetal apropriada contribui para melhorar as propriedades físico-químico-biológicas do solo. Entretanto, a escassez de propágulos microbianos em solos erodidos dificulta o estabelecimento das plantas, uma vez que a formação de uma rizosfera dinâmica é crucial, particularmente em ecossistemas pobres em nutrientes (Herrera et al., 1993). Segundo Janos (1980), a maior parte das áreas destinadas à revegetação é constituída de solos com baixa fertilidade e baixo potencial de inóculo de microrganismos benéficos para as plantas, como os fungos micorrízicos arbusculares e rizóbios, quando espécies leguminosas nodulíferas estão envolvidas.

Para garantir o sucesso da recuperação de áreas degradadas, é necessário selecionar espécies vegetais rústicas, tolerantes aos períodos secos e à baixa fertilidade do solo, bem como capazes de produzir grande quantidade de matéria orgânica e sementes viáveis (Cuenca et al., 1998; Carneiro et al., 1999). Franco et al. (1992) utilizaram uma tecnologia baseada no emprego de espécies de leguminosas arbóreas que receberam inóculos de rizóbios e de FMA como forma de

superar as deficiências de nitrogênio e fósforo em áreas degradadas. Caracterizadas por serem espécies pioneiras, de rápido crescimento, aparecendo em ampla faixa de condições climáticas e edáficas e de elevada produção de biomassa, algumas leguminosas florestais têm recebido destaques importantes na recuperação de solos degradados.

O emprego de microrganismos com a finalidade de aumentar a disponibilidade de nutrientes às plantas em vários sistemas é uma prática que merece investigação por geralmente ser econômica e ecologicamente mais viável. Nas simbioses entre plantas e microrganismos, a interação leguminosas-rizóbio é a de maior expressão econômica. Além disso, a simbiose com fungos micorrízicos geralmente apresenta efeito sinérgico sobre nodulação (Barea & Azcón-Aguilar, 1983). A dupla inoculação é capaz de reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados e fosfatados, por conferir às plantas maior capacidade de absorção desses nutrientes (Burity et al., 2000).

O conhecimento sobre a capacidade das espécies vegetais em formar simbioses com estes fungos e outros microssimbiontes da rizosfera é importante para o sucesso da revegetação e serve de suporte para pesquisas de produção de mudas de espécies nativas formadas em viveiros florestais (Carneiro et al., 1998).

3.2 A RIZOSFERA

O solo é o habitat natural para um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, algas, protozoários, compreendendo

numerosos gêneros e espécies. A variedade, quantidade, bem como a atividade destes organismos variam de solo para solo, sendo influenciadas pelo conteúdo de matéria orgânica, textura do solo, pH, composição química, temperatura, aeração e outros fatores (Chen et al., 2003). Estima-se que em um grama de solo existam mais de 10^4 espécies de microrganismos (Giller et al., 1997). Entretanto, há regiões no solo onde a presença e atividade microbiana são mais intensas, como é o caso da região denominada rizosfera. De acordo com Paul & Clark (1989) e definido por Hiltner (1904), a rizosfera é a região do solo que recebe influência imediata das raízes e na qual ocorre intensa proliferação de microrganismos.

A decomposição dos materiais de origem vegetal e o suprimento de nutrientes para as plantas derivados da atividade microbiana são pontos chaves na formação e no funcionamento da rizosfera (Werner, 1998). Este ambiente é relativamente rico em nutrientes liberados pelas raízes, os exsudatos, que favorecem a atividade metabólica das comunidades microbianas, que por sua vez diferem da microbiota estabelecida em locais sem a influência das raízes. À medida que a distância da rizosfera diminui, aumenta a atividade de microrganismos.

Sendo a rizosfera um ambiente de alta diversidade microbiana, vários tipos de interações podem ocorrer. Estas interações podem ter caráter antagônico, competitivo ou sinérgico, ocorrendo no solo rizosférico e no rizoplano (Andrade, 1999). Estas interações estão sob influência, entre outros fatores, das características do solo, da cobertura vegetal e da composição química dos exsudatos liberados pela planta, os quais agem diretamente sobre a comunidade microbiana e sua atividade, de forma atrativa ou repulsiva (Yang & Crowley, 2000).

Na relação solo-planta, a aquisição de nutrientes pode ser diretamente afetada pela presença, bem como pela ausência de determinados

microrganismos na rizosfera. Os efeitos podem ser benéficos (modificação morfológica das raízes, favorecendo obtenção de nutrientes, decomposição e mineralização da matéria orgânica, fixação biológica de nitrogênio, absorção de P, produção de enzimas, etc.) ou maléficos (imobilização e/ou competição por nutrientes, agentes patogênicos, etc.). Os microrganismos rizosféricos podem aumentar ou diminuir o crescimento das raízes, a formação dos pêlos radiculares e a disponibilidade espacial de nutrientes (Marschner, 1998). O estado nutricional e a produtividade da planta podem ser influenciados pela comunidade microbiana estabelecida na rizosfera.

Além de influenciar diretamente no desenvolvimento da planta, o funcionamento da rizosfera afeta também a qualidade do solo, uma vez que o desenvolvimento microbiano em tais ambientes pode auxiliar as plantas hospedeiras a melhor suportarem condições de estresse hídrico e deficiências minerais, bem como a presença de patógenos de plantas presentes no solo.

Os principais simbioses encontrados no ambiente rizosférico são (i) fungos micorrízicos, os quais contribuem para o estabelecimento das plantas, auxiliando em situações de estresse (deficiência de nutrientes, seca, distúrbios do solo, etc.) (Barea et al., 1997) e (ii) rizóbios – bactérias fixadoras de nitrogênio, as quais permitem que plantas leguminosas se desenvolvam na ausência de nitrogênio mineral disponível no solo por provê-lo a partir da atmosfera. Uma redução no potencial de formar essas simbioses pode diminuir ou mesmo impedir o sucesso da revegetação (Allen, 1989; Roldan & Albaladejo, 1994).

3.3 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Os fungos micorrízicos são membros relevantes das comunidades microsimbióticas mutualísticas da rizosfera, conhecidos por exercer muitas funções críticas para o ecossistema (Smith & Read, 1997).

Existem vários tipos de micorrizas, sendo as ectomicorrizas e as endomicorrizas do tipo arbuscular as de maior importância (Siqueira, 1994). As ectomicorrizas são o tipo mais importante nas florestas de clima temperado, constituídas principalmente por gimnospermas, enquanto que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são predominantes nas florestas tropicais, onde angiospermas predominam (Janos, 1980). Nesta associação ocorre íntima interação entre os parceiros, apresentando integração morfológica e fisiológica, que resulta em alta compatibilidade funcional. A planta beneficia-se pelo aumento da absorção de água e nutrientes, principalmente de fósforo, proporcionado pelas hifas fúngicas, enquanto a planta fornece ao fungo fotoassimilados, permitindo que ele complete seu ciclo, o que, no caso dos FMA, só ocorre na presença do hospedeiro vivo (Silveira, 1992). A simbiose micorrízica arbuscular é o tipo de associação micorrízica mais antiga e mais comumente encontrada. Estima-se que 250.000 espécies de plantas sejam capazes de estabelecer esta simbiose (Smith & Read, 1997). As plantas hospedeiras incluem angiospermas, gimnospermas e pteridófitas, todas possuindo raízes verdadeiras (Read et al., 2000).

Durante o estabelecimento desta simbiose, os fungos penetram as células presentes na região cortical das raízes, formando estruturas semelhantes a haustórios, denominadas arbúsculos, os quais interagem com o citoplasma hospedeiro. Essas estruturas fúngicas promovem aumento na área de superfície

para as trocas metabólicas entre a planta e os fungos. Alguns FMA também produzem vesículas, que possivelmente sejam estruturas de armazenamento de compostos orgânicos geralmente de origem lipídica (Smith & Read, 1997).

Os FMA também interagem diretamente com o solo por meio de suas hifas extrarradiculares, podendo se estender por até 11 centímetros além da rizosfera (Li et al., 1991). As hifas extrarradiculares podem atingir uma área de superfície total com ordens de magnitude diversas vezes superiores comparadas às raízes sozinhas, aumentando o potencial para a obtenção de nutrientes e de água (Rhodes & Gerdemann, 1975). As hifas de FMA também desempenham um papel importante na estabilização dos agregados do solo. Esta simbiose também pode aliviar os efeitos negativos ocasionados por patógenos de plantas (Lugtenberg et al., 1991) e por níveis tóxicos de metais presentes no solo (Nogueira & Cardoso, 2002). Desta forma, a simbiose micorrízica contribui para a sobrevivência e crescimento das espécies, principalmente em ambientes estressantes (Siqueira & Saggin-Junior, 1995), onde os FMA exercem grande influência na estruturação das comunidades vegetais (Siqueira et al., 1994).

O estabelecimento das micorrizas modifica diversos aspectos da fisiologia da planta, incluindo a composição de nutrientes minerais, o balanço hormonal, os padrões de alocação de carbono, etc. (Harley & Smith, 1983). Conseqüentemente, a simbiose micorrízica altera a composição química dos exsudados das raízes enquanto que o desenvolvimento do micélio fúngico no solo serve como uma fonte de carbono para as comunidades microbianas da rizosfera e introduz modificações físicas no ambiente ao redor das raízes (Linderman, 1988). Essas mudanças afetam tanto quantitativamente quanto qualitativamente as

populações microbianas na rizosfera de plantas micorrizadas, região conhecida como micorrizosfera (Barea, 2000).

Microrganismos benéficos, os quais desempenham um papel fundamental nos sistemas solo-planta, podem interagir com fungos micorrízicos na rizosfera (Barea et al., 2002). De particular importância há uma classe de bactérias do solo, demonimadas rizobactérias (Kloepper, 1996), conhecidas pelas suas habilidades em colonizar as raízes e promover o desenvolvimento das plantas, sendo denominadas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP). Fungos micorrízicos também interagem com microrganismos que colonizam as raízes, os microrganismos endofíticos, os quais desempenham atividades envolvidas na promoção do crescimento das plantas e na proteção das mesmas contra patógenos de plantas e níveis elevados de metais pesados presentes no solo (Sturz & Nowak, 2000). Além destes, fungos micorrízicos interagem com bactérias fixadoras de nitrogênio simbiotes e de vida livre, onde FMA se beneficiam do nitrogênio fixado simbioticamente e, em contrapartida, as bactérias promovem o desenvolvimento fúngico (Barea et al., 1997).

Um FMA ideal necessita possuir propriedades como a habilidade para infectar as plantas rapidamente, explorar eficientemente o solo, transferir nutrientes prontamente para o hospedeiro, difundir-se e multiplicar-se, competir eficientemente e colonizar plantas cultivadas sob ampla variação das condições ambientais (Daft, 1983). A seleção de fungos micorrízicos arbusculares eficientes é um pré-requisito chave nos programas de inoculação, uma vez que existem diferentes níveis de compatibilidade entre estes e suas plantas hospedeiras (Roldán et al., 1992) e que a eficiência destes fungos depende, além das espécies de plantas

inoculadas (Caravaca et al., 2003b), também do ambiente em que a associação ocorre.

Existem evidências de que os fungos micorrízicos afetam o crescimento, composição e atividade das comunidades microbianas através da alteração do processo de exsudação radicular (Wamberg et al., 2003). Porém, não se sabe se diferentes isolados de fungos micorrízicos produzem diferentes efeitos nas propriedades bioquímicas do solo, tais como a sua atividade enzimática. Um inóculo de FMA mais eficiente não apenas pode ser decisivo para o desenvolvimento das plantas, mas também para estabelecer propriedades do solo que favoreçam o estabelecimento de outras espécies de plantas autóctones (Alguacil et al., 2005).

3.4 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP)

Muitas bactérias são capazes de estimular o crescimento das plantas por meio de interações diretas ou indiretas com suas raízes, sendo classificadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (Artursson et al., 2005). As RPCP são definidas por meio de suas seguintes características intrínsecas: (I) devem ser capazes de colonizar as raízes; (II) devem sobreviver, bem como se multiplicar em micro-habitats associados com a superfície das raízes por um período suficiente para expressar suas atividades de promoção/proteção na planta hospedeira e (III) devem promover o crescimento das plantas (Barea et al., 2005).

As RPCP podem ser divididas em dois grupos: aquelas envolvidas no ciclo dos nutrientes e na fito-estimulação e aquelas envolvidas no biocontrole de

patógenos de plantas (Bashan & Holguin, 1998). As RPCP, as quais medeiam os processos envolvidos no ciclo dos nutrientes, incluem aquelas relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio não-simbiótico, bem como aquelas responsáveis por aumentar a disponibilidade de fósforo e de outros nutrientes no solo. Muitas bactérias diazotróficas não-simbiontes foram descritas e estão sendo utilizadas como biofertilizantes (Kennedy et al., 2004). Existe um crescente interesse na utilização de RPCP como controladores biológicos de patógenos de plantas, que podem atuar na redução do crescimento saprofítico dos patógenos e conseqüentemente na freqüência de raízes infectadas por meio da competição e/ou antagonismo microbianos (Barea et al., 2005).

3.5 RIZOBACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO – *RHIZOBIUM SPP.*

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para a vida e, em regiões tropicais, é freqüentemente limitante da produção agrícola dado os baixos teores de matéria orgânica encontrados nesses solos. Além disso, são muitos os processos envolvidos na perda desse importante nutriente nos ecossistemas: desnitrificação, volatilização da amônia e queimadas (processos que retornam o N à forma gasosa) e a lixiviação de nitratos para as camadas profundas do solo. Como conseqüência, a maioria dos solos das regiões tropicais é deficiente de N, causando graves limitações ao estabelecimento de plantas e à produção de alimentos. Fertilizantes nitrogenados ou a fixação biológica do nitrogênio são as principais maneiras pelas quais o nitrogênio pode retornar ao solo (Mello & Azevedo, 1998).

Bactérias fixadoras de nitrogênio, tais como *Rhizobium* sp. podem transformar o gás nitrogênio (N₂) presente na atmosfera do solo em compostos nitrogenados, que podem ser assimilados pelas plantas para o seu desenvolvimento (Wheatcroft & Watson, 1988). As bactérias do gênero *Rhizobium* são microrganismos rizosféricos capazes de estabelecer simbiose mutualística com muitos membros de plantas pertencentes à família Leguminosae (principalmente espécies das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae). Nesta associação, as plantas formam em suas raízes estruturas especializadas denominadas nódulos, induzidas pelas bactérias. Após induzir a formação destes, as bactérias acabam por invadí-los e, uma vez dentro do nódulo, penetram no citoplasma da célula hospedeira, através de vesículas derivadas de membranas, iniciando o processo de fixação do nitrogênio atmosférico. A planta, em contrapartida, fornece energia e outros fatores nutricionais para a bactéria (Smith et al., 1972).

A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de nitrogênio de maior importância para a agricultura e por esta razão os rizóbios têm sido os microrganismos diazotróficos mais estudados (Mello & Azevedo, 1998).

Esta fonte de nitrogênio passou a ser valorizada com a crise do petróleo, a qual acarretou altas nos custos dos fertilizantes nitrogenados. Assim, o processo de fixação simbiótica do nitrogênio assumiu grande importância na manutenção da economia de países potencialmente agrícolas (Albino, 2004). Os fertilizantes químicos, além de demandarem altas quantidades de energia na sua produção, geram resíduos tóxicos, resultando em elevados custos econômicos e ambientais (Ladha & Reddy, 2003). A possibilidade da substituição do uso destes produtos pelo processo natural de obtenção de N traz muitas vantagens econômicas e ambientais. Porém, o sucesso da fixação biológica do nitrogênio depende do

profundo conhecimento sobre as bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas hospedeiras e com os demais membros da microbiota do solo e da rizosfera (Mello & Azevedo, 1998).

3.6 UTILIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DE RIZOBACTÉRIAS (RPCP E RIZÓBIOS) NOS PROGRAMAS DE REFLORESTAMENTO

Nos solos degradados, a comunidade microbiana é geralmente reduzida (Boddington & Dodd, 2000) e, em tais situações, a reintrodução de microrganismos rizosféricos benéficos é uma maneira de se auxiliar no restabelecimento da comunidade de plantas nativas (Jeffries & Barea, 2000). O nitrogênio derivado da fixação simbiótica pode ser crítico para o desenvolvimento das plantas em áreas degradadas (Barea et al., 1992) e a simbiose com FMA pode desempenhar um papel fundamental na absorção de fósforo pelas plantas e contribuir para o restabelecimento da vegetação nestes locais (Jeffries & Barea, 1994). Dessa forma, dois dos principais nutrientes de plantas podem ter sua absorção incrementada pela ação de microrganismos.

Nos sistemas de revegetação, a inoculação de plantas com microsimbiontes poderia não apenas ajudá-las no estabelecimento (Herrera et al., 1993), mas também na melhora das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, contribuindo para a qualidade do mesmo (Carrillo-García et al., 1999; Barea et al., 2002).

Segundo Carneiro et al. (1996), além dos efeitos no crescimento inicial e na qualidade das mudas, evidências indicam que a colonização micorrízica

afeta as futuras fases sucessionais das espécies e a estruturação das comunidades vegetais. Desse modo, os FMA são importantes para o reflorestamento artificial, especialmente em solos de baixa fertilidade, onde poderão suprir em parte os requerimentos nutricionais dos hospedeiros, diminuir os custos de implantação e aumentar as chances de estabelecimento das mudas no ecossistema em restauração.

As atividades de bactérias fixadoras de nitrogênio e de microrganismos solubilizadores de fósforo geralmente são maiores na rizosfera de plantas micorrízicas, onde interações sinérgicas com tais microrganismos têm sido demonstradas. O manejo dessas interações é uma ferramenta promissora para o restabelecimento de vegetações naturais em áreas degradadas (Pfleger & Linderman, 1994).

As RPCP podem atuar sinérgicamente com FMA em promover o crescimento de plantas. Alguns estudos demonstraram que RPCP estimulam o desenvolvimento de FMA, sugerindo que RPCP e FMA podem ser co-inoculados com o objetivo de otimizar a formação e o funcionamento da simbiose micorrízica (Artursson et al., 2005). Diversos estudos têm confirmado também o aumento nos níveis de colonização por FMA na presença de determinadas RPCP (Meyer & Linderman, 1986).

Bactérias fixadoras de nitrogênio também podem atuar sinérgicamente com FMA em suas plantas hospedeiras. A nodulação e a fixação biológica de nitrogênio são comumente aumentadas em leguminosas após a colonização micorrízica, provavelmente porque estes fungos fornecem tanto para a planta quanto para rizobactérias o fósforo, o qual é essencial para enzimas envolvidas no processo de fixação biológica do nitrogênio, o qual demanda altas

quantidades de energia na forma de ATP. Por sua vez, as rizobactérias promovem o desenvolvimento micorrízico, por meio de vários mecanismos: (1) efeitos na receptividade da raiz; (2) efeitos no reconhecimento fungo-raiz; (3) efeitos no crescimento fúngico; (4) modificação na química do solo rizosférico; (5) efeitos na germinação dos propágulos fúngicos (Johansson et al., 2004). Todos estes efeitos contribuem para o estabelecimento, sobrevivência e crescimento das plantas por meio da redução do estresse causado por fatores como a limitação de nutrientes e de água (Janos, 1980). Desta forma, mudas micorrizadas apresentam maior índice de pegamento quando transplantadas para o campo, além de apresentarem maior vigor no seu desenvolvimento inicial (Siqueira & Franco., 1988). Inúmeros exemplos deste efeito podem ser encontrados nas relações simbióticas entre bactérias-FMA-leguminosas, em que bactérias diazotróficas fornecem nitrogênio fixado não apenas para a planta, mas também para o fungo (Minerdi et al., 2001).

Alguns mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvendo interações entre fungos micorrízicos e *Rhizobium* sp. para melhorar a produtividade em leguminosas têm sido discutidos. A maioria das leguminosas pertencentes aos gêneros da família Mimoseae pode nodular e fixar nitrogênio, além de serem capazes de estabelecer simbiose mutualística com FMA (Patreze & Cordeiro, 2004).

Um grande número de experimentos têm objetivado determinar os benefícios a longo prazo da inoculação desses dois tipos de microssimbiontes de plantas não apenas no estabelecimento de espécies leguminosas alvo, mas também no benefício induzido por estes nas propriedades físico-químicas-chaves do solo, propiciando condições para que outras espécies das etapas sucessionais se estabeleçam (Herrera et al., 1993; Requena et al., 2001). De fato, como resultado do processo de degradação/desertificação, o distúrbio em comunidades naturais de

plantas é freqüentemente acompanhado ou precedido pela deterioração das propriedades físico-químicas e biológicas do solo, tais como a estrutura, disponibilidade de nutrientes, conteúdo de matéria orgânica, atividade microbiana, etc. Desta forma, faz-se necessário recuperar esses atributos da qualidade do solo e uma das ferramentas para tal é o manejo das interações microbianas na micorrizosfera (Barea & Jeffries, 1995).

3.7 CARBOIDRATOS DO SOLO

A matéria orgânica do solo é um dos componentes essenciais dos ecossistemas. A depleção da matéria orgânica causa perda na capacidade de retenção de água, diminui a agregação das partículas do solo, acelera o processo de erosão, reduz a retenção de nutrientes e as atividades biológicas e enzimáticas (Ghani et al., 2003). A estabilidade estrutural do solo está correlacionada com o conteúdo de matéria orgânica (Chaney & Swift, 1984). Os carboidratos do solo (polissacarídeos), os quais freqüentemente representam 10-20% da matéria orgânica, são os constituintes orgânicos que estão mais relacionados ao processo de agregação das partículas do solo (Sparling & Cheshire, 1985). Haynes et al. (1991) encontraram que a fração de carboidratos do solo extraídos em água quente está mais correlacionada com a estabilidade de agregados do que o conteúdo total de matéria orgânica do solo. Em trabalho posterior, Haynes & Francis (1993) verificaram que esta fração de carboidratos apresentava alto conteúdo de açúcares de origem microbiana. Segundo Sparling et al (1981), a estabilidade dos agregados

do solo pode ser diretamente atribuída às hexoses, açúcares típicos de origem microbiana.

A conversão das florestas em áreas cultiváveis é freqüentemente acompanhada por um declínio no conteúdo de carbono orgânico no solo. A magnitude de tal declínio é influenciada pela intensidade do cultivo, tipo de solo, textura, mineralogia, bem como pelo clima, sendo geralmente mais elevada em ambientes quentes (Mbagwu & Piccolo, 1998). A avaliação da perda do conteúdo de carbono orgânico no solo é uma prática necessária para se selecionar formas de manejo menos agressivas (Drozd et al., 1997). Tal avaliação é especialmente relevante em regiões tropicais onde as taxas de desmatamento são alarmantes (Lal, 1986).

Os carboidratos no solo são os principais componentes lábeis da matéria orgânica, sendo assim a fração mais afetada pela utilização do mesmo (Cambardella & Elliot, 1992). Embora seu papel em melhorar a estrutura física do solo a longo prazo seja controverso, os carboidratos são importantes fontes de energia para a atividade microbiana (Insam, 1996). Gomas extracelulares e mucilagens produzidas durante a oxidação microbiana da matéria orgânica temporariamente estabilizam os agregados do solo, protegendo-os da deformação causada pelo impacto das gotas de chuvas quando atingem a superfície do solo. Devido à sua natureza lábil, o efeito das práticas de manejo do solo nas concentrações de carboidratos são maiores do que em relação àquelas sofridas por seus componentes mais estáveis, como as frações humificadas (Piccolo, 1996).

3.8 ENZIMAS DO SOLO

Todas as transformações bioquímicas do planeta são dependentes ou relacionadas à atividade das enzimas. No solo, as principais reações de transformação são mediadas principalmente pelas hidrolases e oxirredutases que controlam os processos de decomposição dos materiais orgânicos e transformações inorgânicas.

Acredita-se que as enzimas do solo primariamente derivam de microrganismos, mas também se originam de plantas e animais (Weaver et al., 1994). A atividade enzimática do solo resulta principalmente da ação de enzimas extracelulares que podem estar livres na solução do solo, adsorvidas em seus colóides ou immobilizadas em complexos húmicos (Body & Mortland, 1990) e das intracelulares que, após a lise das células, podem atuar também como enzimas extracelulares (Weaver et al., 1994). Por serem proteínas e, portanto, possuírem cargas, dificilmente ocorrem livres no solo. Nas células vivas em proliferação, localizam-se no citoplasma, membrana plasmática, na parede celular ou são excretadas no meio. Ocorrem também em células viáveis em estado de dormência como esporos, células vegetais em repouso, cistos de protozoários e sementes de plantas. Nos restos biológicos encontram-se aderidas a células mortas intactas, a fragmentos celulares ou liberados de células desintegradas e nos componentes do solo acham-se geralmente complexadas com substâncias húmicas, argila ou com o próprio substrato sobre o qual atua (Moreira & Siqueira, 2002).

Embora existam milhares de enzimas em uma única célula microbiana, apenas pouco mais de 50 foram identificadas ou tiveram suas atividades detectadas no solo. Mesmo assim, estas têm importância na decomposição de

resíduos e na fertilidade do solo, na eficiência de uso dos fertilizantes, nas interações entre plantas, no estado de oxi-redução do solo, além de servirem como indicadores da qualidade do solo e também da presença de poluentes (Burns, 1978).

Numerosos estudos têm relatado o uso potencial das atividades enzimáticas como indicadores da produtividade ou atividade microbiana (Weaver et al., 1994). Os efeitos na população e dinâmica microbianas devido as práticas de manejo do solo também podem refletir nas atividades enzimáticas do solo (Deng & Tabatabai, 1997).

As propriedades biológicas do solo também determinam a qualidade e fertilidade do mesmo e, conseqüentemente, sua capacidade de permitir o estabelecimento e a produtividade das plantas (Pascual et al., 2000). A atividade microbiana do solo é freqüentemente avaliada por parâmetros biológicos e bioquímicos tais como as atividades enzimáticas (De Luca & Keeney, 1993).

A mineralização da matéria orgânica no solo envolve vários processos metabólicos com a ativa participação de enzimas como catalisadoras destes processos. As atividades enzimáticas têm sido relatadas, devido a esta importância, como indicadores da qualidade do solo, uma vez que controlam a liberação de nutrientes para as plantas e para o crescimento microbiano (Burns, 1978). São candidatas a “sensores”, uma vez que integram informações, por um lado, sobre o *status* microbiano, e pelo outro, sobre as condições físico-químicas do solo. As atividades enzimáticas do solo têm grande potencial em fornecer uma avaliação biológica integrada, devido as suas estreitas relações com a biologia do solo, serem fáceis de quantificar e respondem rapidamente frente às mudanças ocorridas durante o manejo do solo (Bandick & Dick, 1999; Dick, 1994). Entretanto faz-se necessário determinar um número de atividades enzimáticas representativas

de um amplo espectro de funções microbianas, a fim de se representar de forma confiável a condição atual do solo (Nannipieri, 1994).

A atividade enzimática pode ser medida pela incubação de uma amostra contendo a enzima em questão com seu substrato. Depois de um período apropriado, um ou mais dos produtos de reação ou então a quantidade de substrato consumido pela reação são mensurados. A atividade enzimática no solo pode ser quantificada de modo similar. Cada enzima exerce sua ação numa determinada faixa de pH e temperatura, mas existe um valor de pH e temperatura ótimos, em que sua atividade é máxima. A quantidade de substrato utilizado ou dos produtos finais de reação também é governada pelo tipo de solo, estação do ano e tipo de vegetação. Devido ao fato de que a maioria das enzimas possuem origem microbiana, não é de se surpreender que fatores que afetem a comunidade microbiana também influenciem a atividade enzimática no solo (Alexander, 1977). Práticas tais como a adubação orgânica e diferentes sistemas de uso do solo promovem alterações na biomassa, na produção de metabólitos microbianos, nos compostos húmicos estáveis (Moreira & Siqueira, 2002) e, conseqüentemente, nas atividades enzimáticas do solo. Diversos estudos têm discriminado o perfil das atividades enzimáticas entre uma ampla variedade de sistemas de uso do solo. Sabe-se que o uso inadequado do solo pode causar diminuição da biomassa microbiana e em sua atividade (Gupta & Germida, 1988). Em seu trabalho, Dick (1984) demonstrou que, quando o plantio direto foi empregado, algumas atividades enzimáticas foram mais elevadas, quando comparado ao plantio convencional. Embora existam muitos estudos correlacionando as atividades enzimáticas do solo com as práticas de manejo, muito pouco se conhece sobre esses efeitos em condições tropicais/subtropicais. Balota et al. (2004), ao conduzirem seus estudos em

condições subtropicais, obtiveram resultados semelhantes aos apresentados por Dick (1984). Nesse contexto, a avaliação das atividades enzimáticas pode ser usada como indicadora da atividade biológica ou dos processos bioquímicos no solo.

As atividades de enzimas extracelulares no solo, além de serem reguladas indiretamente pelo aumento da produção e secreção pelos microrganismos, podem também ser reguladas diretamente pelas condições físico-químicas do ambiente (Sinsabaugh, 1994). Como um biorreator, as condições físico-químicas influenciadas por propriedades tais como o teor de carbono orgânico, nitrogênio total, conteúdo de fosfato disponível, força iônica, pH e conteúdo hídrico são decisivas para modular a atividade de suas enzimas (Aon & Colaneri, 2001).

As enzimas isoladas do solo geralmente são caracterizadas pela alta estabilidade térmica, maior resistência ao ataque de proteases e pelo menor V_{max} e maior K_m quando comparadas com enzimas de outras origens adicionadas ao solo. Portanto, apesar de serem mais resistentes, apresentam menor eficiência catalítica e reduzida afinidade com o substrato (Burns, 1978).

Estas enzimas estão sujeitas a grande interação com o meio. Podem sofrer adsorção, desnaturação e biodegradação antes de atuar sobre o substrato. A imobilização das enzimas nos colóides inorgânicos do solo, ou nas substâncias húmicas, formando complexos orgânicos ou organo-minerais, também influencia sua atividade (Moreira & Siqueira, 2002). Geralmente, esta imobilização ou adsorção estabilizam suas atividades, evitando alterações em suas energias de ativação, aparente pH ótimo e taxas de reciclagem (Aon & Colaneri, 2001).

As fosfatases desempenham importante papel na mineralização do fósforo orgânico e conseqüentemente no ciclo do mesmo. São ubíquas no solo e são extensivamente estudadas porque catalisam a hidrólise de fosfomonoéster

orgânico em fósforo inorgânico, disponibilizando este último para as plantas (Amador et al., 1997). De acordo com seu pH ótimo, as fosfatases são classificadas em ácidas (pH 6,5) ou alcalinas (pH 11). Uma das mais interessantes propriedades das fosfatases ácida e alcalina são suas especificidades. Embora a maioria das informações disponíveis em relação a estas enzimas estejam relacionadas a fosfatase ácida nos solos, sabe-se que estas enzimas hidrolizam uma variedade de fosfomonoésteres. Estudos conduzidos por Tabatabai & Bremner (1969) demonstraram que a atividade da fosfatase ácida é predominante em solos ácidos e que a atividade da fosfatase alcalina predomina em solos alcalinos. Uma vez que plantas superiores são destituídas de fosfatases alcalinas (Dick et al., 1983), a atividade desta enzima no solo parece ser atribuída totalmente aos microrganismos. Dentre todos os métodos disponíveis para se avaliar a atividade das fosfatases no solo, o desenvolvido por Tabatabai & Bremner (1969) é o mais rápido, acurado e preciso. Este envolve a estimativa colorimétrica de *p*-nitrofenol liberado quando o solo é incubado em uma solução tamponada de *p*-nitrofenilfosfato e tolueno (Weaver et al., 1994).

A oxidação biológica de compostos orgânicos é geralmente um processo de deidrogenação e existem muitas enzimas relacionadas a este processo, denominadas deidrogenases, as quais são altamente específicas. Estes sistemas enzimáticos, presentes em microrganismos, aparentemente desempenham relevante papel na oxidação da matéria orgânica do solo (Trevors, 1984). Essa propriedade é utilizada principalmente para se avaliar a influência de manejos na qualidade do solo e também para avaliar o grau de recuperação de solos degradados. O método mais utilizado para a determinação da atividade das deidrogenases no solo é o que foi desenvolvido por Lenhard (1956). Esse método envolve a determinação

colorimétrica de 2,3,5-trifenil formazan (TPF) produzido pela redução do cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) pelos microrganismos do solo (Weaver et al., 1994).

A L-glutaminase está entre as amidohidrolases que desempenham um importante papel no suprimento de nitrogênio para as plantas. A reação catalizada por esta enzima envolve a hidrólise de L-glutamina em ácido glutâmico e amônia. L-glutaminase é amplamente distribuída na natureza. Plantas e microrganismos são as mais prováveis fontes da atividade desta enzima nos solos. Entretanto, acredita-se que a maior parte seja de origem microbiana (Roberts et al., 1972). O método proposto por Frankenberger e Tabatabai (1991) para a determinação de sua atividade nos solos envolve a determinação da quantidade de amônia liberada por sua atividade quando o solo é incubado com uma solução tamponada (0.1 M de THAM, pH 10) de L-glutamina e tolueno a 37°C (Weaver et al., 1994).

A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da uréia, liberando gás carbônico e amônia. É amplamente distribuída na natureza, detectada em microrganismos, plantas e animais. Diversas razões justificam a vasta literatura encontrada em relação a esta enzima. Primeiramente porque a urease foi a primeira enzima a ser cristalizada; seus produtos de reação são relativamente fáceis de serem determinados; podem ser purificadas de várias fontes e a uréia é um importante fertilizante (Weaver et al., 1994). Uma variedade de métodos são utilizados para se determinar a atividade ureásica nos solos. Muitos destes envolvem a determinação de amônia liberada durante a incubação do solo tratado com tolueno em uma solução tamponada de uréia, como o proposto por Tabatabai & Bremner (1972). A determinação da atividade desta enzima é amplamente utilizada na

avaliação de mudanças na qualidade do solo ocorridas em função do manejo do mesmo (Klose & Tabatabai, 2000).

A enzima L-asparaginase também desempenha um importante papel na mineralização do N dos solos. Esta enzima catalisa a hidrólise da L-asparagina, produzindo ácido aspártico e amônia. A natureza química do nitrogênio nos solos se dispõe de tal maneira que uma ampla proporção (15-25%) do nitrogênio total do solo é freqüentemente liberado na forma de amônia, pela hidrólise ácida. Algumas evidências sugerem que a porção de amônia liberada provém da hidrólise de resíduos de asparagina ou glutamina presentes na matéria orgânica do solo (Sowden, 1958). A L-asparaginase está amplamente distribuída na natureza, sendo descrita tanto em plantas quanto em microrganismos (Winston, 1971). Sua atividade nos solos é testada de modo muito simples, adicionando-se L-asparagina nos solos e monitorando a quantidade de amônia liberada. O método proposto por Tabatabai (1991) envolve a determinação da quantidade de amônia liberada pela atividade da L-asparaginase quando o solo é incubado em uma solução tamponada (0.1 M de THAM, pH 10) de L-asparagina e tolueno a 37°C (Weaver et al., 1994).

A celulose é o polissacarídeo estrutural mais abundante na parede celular das plantas. A degradação microbiana da celulose é, por estar razão, um importante processo na degradação dos debrís vegetais (Rai & Srivastava, 1983). As celulasas catalisam a hidrólise da celulose em D-glicose. A degradação da celulose nos solos é um processo lento e depende da concentração, localização e mobilidade das celulasas (Hayano, 1986). O tipo de material vegetal, a concentração dos substratos, o pH, a temperatura e conteúdo hídrico significativamente afetam a degradação da celulose (Kshattriya et al., 1992; Sinsabaugh & Linkins, 1988). Uma maior atividade celulásica ocorre no solo rizosférico, em relação ao solo não-

rizosférico. As celulases do solo são principalmente produzidas por fungos (Yamana et al., 1970; Clark & Stone, 1965). Os efeitos da vegetação, estação do ano e os tipos de manejos agrícolas na atividade celulásica são estudados extensivamente (Kiss et al., 1978). Diversos métodos estão disponíveis para se estimar a atividade celulásica no solo. Baseiam-se na determinação da quantidade de açúcares redutores liberados após a degradação da carboximetil celulose utilizada como substrato (Schinner & von Mersi, 1990).

As amilases também são importantes enzimas no solo, as quais são parcialmente responsáveis pela decomposição dos materiais derivados de plantas (Pancholy & Rice, 1973). São produzidas por animais, plantas e microrganismos, sendo enzimas universais em fungos (Cochrane, 1958). Catalisam a hidrólise do amido, em que as unidades de glicose são seus principais produtos de hidrólise. Variações na precipitação anual e no conteúdo de carbono orgânico do solo justificam muitas das variações em sua atividade. Esta parece estar estritamente relacionada à composição da matéria orgânica do solo ao invés da quantidade de matéria orgânica propriamente dita (Ross, 1966). Diversos métodos também estão disponíveis para se estimar a atividade amilásica no solo, baseando-se na determinação da quantidade de açúcares redutores liberados (Pancholy & Rice, 1973).

Diversos estudos foram conduzidos no intuito de se avaliar o efeito da inoculação de FMA e outros microssimbiontes rizosféricos sobre as atividades enzimáticas no solo. No entanto, estes estudos se restringem, em sua maioria, a climas semi-áridos e desérticos. Caravaca et al. (2003a) ao analisarem o efeito da inoculação do fungo *Glomus intraradices* na rizosfera de *Retama sphaerocarpa*, verificaram um aumento nas atividades das enzimas urease e fosfatase ácida, em

torno de 115% e 79% respectivamente, em relação ao controle. Em outro estudo, Caravaca et al. (2003b) também verificaram um aumento nas atividades da urease, deidrogenase, fosfatase ácida, protease BAA e β -glucosidade na rizosfera de *Olea europaea* também na presença de *Glomus intraradices*. Alguacil et al. (2005) conduziram um estudo envolvendo *Retama sphaerocarpa* e *Olea europaea* no intuito de se verificar a influência de FMA nativos e alóctones no desenvolvimento e nas propriedades bioquímicas na rizosfera destas plantas. Puderam também constatar um aumento expressivo nas atividades enzimáticas na rizosfera de ambas plantas, sendo que os valores mais elevados ocorreram nas plantas inoculadas com FMA nativos. Estes resultados permitem inferir mudanças na fertilidade do solo, uma vez que estas enzimas estão relacionadas ao processo de mineralização de importantes nutrientes tais como o N, P além do C. (Ceccanti et al., 1994).

Devido à necessidade de se encontrar alternativas ambientalmente e economicamente viáveis para serem implementadas nos programas de reflorestamento, propôs-se o estudo do efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e de rizobactérias sobre as atividades enzimáticas na rizosfera de espécies leguminosas nativas destinadas ao reflorestamento.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, U. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas associadas à planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* e seu potencial como inoculante de plantas arbóreas na presença de fungos micorrízicos arbusculares. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 73 p., 2004.
- ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley & Sons, New York, 467 p., 1977.
- ALGUACIL, M.M.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean degraded environment. *Biology and Fertility of Soils*, 41:59-68, 2005.
- ALLEN, E.B. The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environment*, 17:279-286, 1989.
- AMADOR, J.A.; GLUCKSMAN, A.M.; LYONS, J.B.; GORRES, J.H. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. *Soil Science* 162:808-825, 1997.
- ANDRADE, G. Interacciones microbianas em la rizosfera. In: Siqueira, J.O; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S., et al. (Eds.). *Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships*. Lavras: UFLA Editor, p. 551-575, 1999.
- AON, M.A.; COLANERI, A.C. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18:255-270, 2001.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, (online early):1-10, 2005.
- BALOTA, E. L.; KANASHIRO, M. COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, P. D. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 300-306, 2004.

- BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:1471-1479, 1999.
- BAREA, J.M.C.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy*. 36: 1-54, 1983.
- BAREA, J.M.C.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Methods in Microbiology*. 24:391-416, 1992.
- BAREA, J.M.; JEFFRIES, P. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. In: HOCK, B.; VARMA, A. *Mycorrhiza structure function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 521-559, 1995.
- BAREA, J.M.C.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: GANGE, A.C.; BROWN, V.K. *Multitrophic interactions in terrestrial systems* Backwell Science, Cambridge, United Kingdom, p. 65-67, 1997.
- BAREA, J.M. Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, L.; HOMMA, YL; KODAMA, F.; KONDON, N.; AKINO, S. *Plant growth-promoting rhizobacteria*. Biological Resource Management: Connecting Science and Policy INRA, Editions and Springer, 2000.
- BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Kluwer Academic Publishers*, 81:343-351, 2002.
- BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778, 2005.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting rhizobacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:1225-1228, 1998.
- BODDINGTON, C.L.; DODD, J.C. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II. Studies in experimental microcosm. *Plant and Soil* 218:145-157, 2000.
- BODY, S.A.; MORTLAND, M.M. Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complexes. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G. *Soil Biochemistry*, 6:1-28, 1990.

- BROWN, S.; LUGO, A. E. Rehabilitation of tropical lands: a key to sustaining development. *Restoration Ecology*, 2:97-111, 1994.
- BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C.P.; SOUZA, E.S.; MERGULHÃO, A.C.E.S.; SILVA, M.L.R.B. Effectiveness of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* sp. On *Mimosa caesalpinifolia* seedlings, under different phosphorus levels. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 4-35:801-807, 2000.
- BURNS, R. G. *Soil enzymes*. Academic Press, New York, 364 p., 1978.
- CAMBARDELLA, C.A.; ELLIOT, E.T. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal*, 56:777-783, 1992.
- CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; FIGUEROA, D.; BAREA, J.M.; RÓLDAN, A. Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management*, 182:49-58, 2003a.
- CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; FIGUEROA, D.; ROLDÁN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Applied Soil Ecology*, 20:107-118, 2003b.
- CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C.; GOMES, L.J.; CURI, N.; VALE, F.R. Mycorrhizal fungi and superphosphate on growth of tropical woody species. *Scientia Forestalis*, 50:21-36, 1996.
- CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S.A.; JUNIOR, O.J.S. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne*, 4:129-145, 1998.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 3-9: 1669-1677, 1999.
- CARRILLO-GARCÍA, A., LEON DE LA LUZ, J.L.; BASHAN, Y.; BETHENFALVAY, G.J. Nurse plants, mycorrhizae and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran. *Desert Restoration Ecology*, 7:321-335, 1999.

- CECCANTI, B.; PEZZAROSSA, B.; GALLARDO-LANCHO, F.J.; MASCIANDARO, G. Bio-tests as markers of soil utilization and fertility. *Geomicrobiology Journal*, 11:309-316, 1994.
- CHANEY, K.; SWIFT, R.S. The influence of organic matter on aggregate stability in some British soils. *Journal of Soil Science*, 35: 223-230, 1984.
- CHEN, G.; ZHU, H.; ZHANG, Y. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology*, 154: 393-398, 2003.
- CLARK, A.E.; STONE, B.A. Properties of a β -1-4-glucan hydrolase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal* 96: 802-807, 1965.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. London, John Wiley, 524 p., 1958.
- CUENCA, G.; ANDRADE, Z.; ESCALANTE, G. Diversity of glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 30-6: 711-719, 1998.
- DAFT, M. J., The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. *Plant and Soil*, 71:331-337, 1983.
- DE LUCA, T.H.; KEENEY, D.R. Soluble antrone reactive carbon in soils: effect of carbon and nitrogen amendments. *Soil Science Society of America Journal* 57:1296-1300, 1993.
- DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils*, 24:141-146, 1997.
- DICK, R.P.; JUMA, N.G.; TABATABAI, M.A. Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. *Soil Science*, 136:19-25, 1983.
- DICK, W.A. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. *Soil Science Society of America Journal*, 48:569-574, 1984.
- DICK, R.P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. *Defining soil quality or a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Madison, p. 107-124, 1994.

- DROZD, J.; GONET, S.S.; SENESI, N.; WEBER, K. *The role of humic substances in the ecosystem and in environmental protection*. IHSS-Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland, p.257-261, 1997.
- EWEL, J.J. *Restoration is the ultimate test of ecological theory*. New York: Cambridge University Press, p. 31-33, 1992.
- FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R.; FARIA, S. M. *Revegetação de solos degradados*. Brasília: Embrapa-CNPS. p.8 (Embrapa-CNPS. Comunicado técnico, 1992).
- FRANKENBERGER, W.T.; TABATABAI, M.A. Asparaginase activity of soils. *Biology and Fertility of Soils*, 11:6-12, 1991.
- GHANI, A.; DEXTER, M.; PERROTT, K.W. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1231-1243, 2003.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6:3-16, 1997.
- GUPTA, V.V.S.R.; GERMIDA, J.J. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, 20:777-786, 1988.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, p. 483, 1983.
- HAYANO, K. Cellulase complex in tomato field soil: induction, localization and some properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 215-219, 1986.
- HAYNES, R.J.; SWIFT, R.S.; STEPHEN, R.C. Influence of mixed cropping rotations (pasture-arable) on organic matter content, water stable aggregation and clod porosity in a group of soils. *Soil Tillage Reserch*, 19:77-87, 1991.
- HAYNES, R.J.; FRANCIS, G.S. Changes in microbial biomass C, soil carbohydrate composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *Journal of Soil Science*, 44:665-675, 1993.

- HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:129-133, 1993.
- INSAM, H. Microorganism and humus in solils. In: PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, p. 265-292, 1996.
- JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, 12: 56-64, 1980.
- JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In: GIANINAZZI, S.; SCHUEPP, H. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland, p. 101-115, 1994.
- JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. *Arbuscular Mycorrhiza – a key component of sustainable plant-soil ecosystems*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, p. 95-113, 2000.
- JOHANSSON, J.; PAUL, L.R.; FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48:1-13, 2004.
- KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKES, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophicus in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1229-1244, 2004.
- KISS, S.; DRAGAN-BULARDA, M.; RADULESCU, D. Soil polysaccharidases: activity and agricultural importance. In: BURNS, R. G. *Soil Enzymes*. Academic Press, New York, p.117-147, 1978.
- KLOEPPER, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* 46:406-409, 1996.
- KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 31:191-199, 2000.
- KSHATTRIYA, S.; SHARMA, G.D.; MISHRA, R.R. Enzyme activities related to litter decomposition in the forest of different age and altitude in North East India. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:265-270, 1992.

- LADHA, J.K.; REDDY, M.P. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. *Plant and Soil*, 252:151-167, 2003.
- LAL, R. Conversion of tropical rainforest: potential and ecological consequences. *Advances in Agronomical*, 39:173-263, 1986.
- LI, X.L.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. Acquisition of phosphorus and clove by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil*, 136: 49-57, 1991.
- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78: 366-371, 1988.
- LUGTENBERG, B.J.J.; WEGER de L.A.; BENNETT, J.W. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion in Microbiology*, 2:457-464. 1991.
- MACEDO, A.C. *Revegetação: matas ciliares e de proteção ambiental*. São Paulo: Fundação Florestal, 24 p., 1993.
- MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crop Research*, 56:203-207, 1998.
- MBAGWU, J.S.C.; PICCOLO, A. Water-dispersible clay in aggregates of forest and cultivated soils in southern Nigeria in relation to organic matter constituents. In: BERGSTROM L., KIRCHAM, H. *Carbon and nutrient dynamics in natural and agricultural ecosystems*. p. 71-83. CAB internacional, UK., 1998.
- MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 488 p., 1998.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 185-190, 1986.
- MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A.; BONFANTE, P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:725-732, 2001.
- MOREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, J.Q. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 625 p., 2002.

- NANNIPIERI, P. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, D.M.; GUPTA, V.V.S.R.; GRACE, P.R. *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Australia, p. 238-244, 1994.
- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; HAMPP, R. Manganese toxicity and callose deposition in leaves are attenuated in mycorrhizal soybean. *Plant and Soil*, 246:1-10, 2002.
- PANCHOLY, S.K.; RICE, E.L. Soil enzymes in relation to old field succession: amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease. *Soil Science Society of America*, 37:47-50, 1973.
- PASCUAL, J.A.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, M.T.; MORENO, J.L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. *Soil biology and Biochemistry*, 32:1877-1883, 2000.
- PATREZE, C.M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. *Forest Ecology and Management*, 196:275-285, 2004.
- PAUL, E.A.; CLARK F.E. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, INC. USA, 328 p., 1989.
- PERRY, D.L.; MOLINA, R.; ARAMANTHUS, M.P.; mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. *Canadian Journal of Forest Research*, 8-17: 929-940, 1987.
- PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press, St. Paul, MN., 212 p., 1994.
- PICCOLO, A.; ZENA, A.; CONTE, P. A comparison of acid hydrolyses for the determination of carbohydrates in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 27:2909-2915, 1996.
- RAI, B.; SRIVASTAVA, A.K. Decomposition and competitive colonization of leaf litter by fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 15:115-117, 1983.
- READ, D.J. DUCKETT, J.G.; FRANCIS, R.; LIGRONE, R.; RUSSEL, A. Symbiotic fungal associations in "lower" land plants. *Biological Sciences*, 355:815-830, 2000.

- REQUENA, N.; PEREZ-SOLIS, E.; AZCÓN-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 495-498, 2001.
- RHODES, L.H.; GERDEMANN, J.W. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist*, 75: 555-561, 1975.
- ROBERTS, J.; HOLCENBER, J.S.; DOLOWY, W.C. Isolation, crystallization and properties of Achromobacteraceae, glutaminase-asparaginase with antitumor activity *Journal of Biology and Chemistry*, 247: 84-90, 1972.
- ROLDÁN, Á.; DÍAZ, G.; ALBALADEJO, J. Effect of VAM-fungal inoculation on growth and phosphorus uptake of two *Hedysarum* species in a Xeric Torrorthent soil from southeast Spain. *Arid Soil Reserch Rehabilitation*, 6:33-39, 1992.
- ROLDÁN, Á.; ALBALADEJO, J. The effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* in a semiarid soil. *Biology and Fertility of Soils*, 18:143-149, 1994.
- ROSS, D.J. A survey of activities of enzymes hydrolyzing sucrose and starch in soils under pasture. *Journal of Soil Science*, 17:1-15, 1966.
- SCHINNER, F.; VON MERSI, W. Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:511-515, 1990.
- SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Absorption cellulase components by leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 20:927-931, 1988.
- SINSABAUGH, R.L. Enzymatic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils*, 17:69-74, 1994.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. *Biotechnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas*. Lavras: MEC/ABEAS, 236 p., 1988.
- SIQUEIRA, J.O. Micorrizas Arbusculares. In: ARAUJO, R.S; HUNGRIA, M. (Eds). *Microrganismos de importância agrícola*. EMBRAPA: SPI, p. 151-194, 1994.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M; ARAUJO, R.S. *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. EMBRAPA, Brasília: EMBRAPA, 142 p., 1994.

- SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O. J. The importance of mycorrhizae association in natural in low fertility. In: MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; SILVA, A.F. (Eds). *Symposium on Environmental Stress: maize in perspective*. Anais Sete Lagoas: EMBRAPA, p. 240-280, 1995.
- SKUJINS, J.; ALLEN, M.F. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *Mircen Journal*, 2:161-176, 1986.
- SMITH, B.E.; LOWE, D.J.; BRAY, R.C. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Electron-paramagnetic-resonance studies on the catalytic mechanism. *Biochemistry Journal*, 130: 641-643, 1972.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego, 605 p., 1997.
- SOWDEN, F.J. The forms of nitrogen in the organic matter of different horizons of soil profiles. *Canadian Journal of Soil Science*, 38:147-154, 1958.
- SPARLING, G.P.; CHESHIRE, M.V.; MUNDIE, C.M.; MURAYAMA, S. Transformation of glucose in sterilized soil inoculated with selected microorganisms. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 18: 447- 457, 1981.
- SPARLING, G.P.; CHESHIRE, M.V. Effect of periodate oxidation on the polysaccharide content and microaggregate stability on rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Plant and Soil*, 88:113-122, 1985.
- STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic community of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15:183-190, 2000.
- TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1: 301-307, 1969.
- TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Assay of urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 4:479-487, 1972.
- TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry*, 16:673-674, 1984.
- YAMANA, K.; SUZUKKI, H.; NISHIZAWA, K. Purification and properties of extracellular and cellbound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *Journal of Biology and Chemistry*, 7:291-295, 1970.

- YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:345-351, 2000.
- WAMBERG, C.; CHRISTENSEN, S.; JAKOBSEN, I.; MÜLLER, A.K., SORENSEN, S.J. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry*, 35:1349-1357, 2003.
- WARREN, A.; SUD, Y.C.; ROZANOV, B. The future of deserts. *Journal of Arid Environment*. 32:75-89, 1996.
- WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America, Madison, p. 775-833, 1994.
- WERNER, D. Organic signals between plants and microorganisms. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interfaces*. Marcel Dekker Inc., New York, 1998.
- WHEATCROFT, R.; WATSON, R.J. Distribution of insertion sequences *ISRml* in *Rhizobium meliloti* and other Gram-negative bacteria. *Journal of Genetic Microbiology*, 134:113-121, 1988.
- WINSTON, J.C., Jr. L-Asparaginase. *The enzymes*. Vol. 4 Academic Press, New York, 400 p., 1971.
- ZANGARO, W. *Micorrizas arbusculares em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi (PR) e suas relações com os grupos sucessionais*. 1997. 171 p. Tese (Doutoramento) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 171 p., 1997.

Type of contribution: Original Paper

Date of Preparation: November 28th, 2005.

Number of pages: 37

Number of figures: 12

Enzymatic activities in the rhizosphere of indigenous woody legume trees mediated by rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza

Knob, A.^a, Nogueira, M. A.^{a*}, Lovato, G. M.^a, Lima, D. S.^a, Dall’Agnol, R.^a; G. Andrade^a

^a Universidade Estadual de Londrina, CCB, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina - PR, Brazil.

*** Corresponding author. Phone/Fax. No 55 43 3371 4791; E-mail nogueira@uel.br**

Enzymatic activities in the rhizosphere of indigenous woody legume trees mediated by rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza

Abstract

Early soil-quality indicators may be useful when monitoring plant reestablishment, especially in degraded environments. Among soil-quality indicators, soil enzymes may reflect the potential in turning some nutrients available for plants, since most of them are related to nutrients transformation in soil. Besides the intrinsic effects of vegetation on soil enzymes, microbial associations may also change their activities, either directly or indirectly due to changes on plant physiology. The objective of this work was to assess the activity of eight enzymes (acid phosphatase, alkaline phosphatase, dehydrogenase, asparaginase, urease, glutaminase, cellulase and amylase) in addition to the hot water soluble carbohydrates (HWCH) in the rhizosphere of four native woody leguminous species when associated to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobacteria. The experimental design was entirely randomized in a 4x5x2 factorial arrangement: four leguminous species (Anadenanthera colubrina, Enterolobium contortisiliquum, Parapiptadenia rigida and Peltophorum dubium, a non-noduliferous species), used in reforestation programs in southern Brazil; five mycorrhizal status (Glomus clarum, G. etunicatum, G. intraradices, Gigaspora margarita and a non-mycorrhizal control); with or without rhizobacteria (Rhizobium sp. or Burkholderia sp. in the non-noduliferous species), in four replications in a greenhouse experiment using 2-kg pots containing low-fertility sandy soil. The best plant growth was found in the associations with G. clarum and G. margarita, while the rhizobacteria effects were less pronounced. Plant species was the factor that most affected the enzyme activity, but the microbial inoculation (AMF or rhizobacteria) also caused some effects, stimulating or decreasing enzyme activity, depending on the plant species. Among the four plant species, the non-noduliferous P. dubium showed a more active rhizosphere when associated to AMF and rhizobacteria. A more biochemically active rhizosphere may confer to this plant an ecophysiological advantage when used in reclamations of degraded and low-fertility environments. A principal component analysis (PCA) showed that P. dubium and P. rigida had similar enzymatic activities in their rhizospheres, while E. contortisiliquum and A. colubrina showed dissimilar patterns of enzymatic activities, independently of microbial inoculation.

Keywords: arbuscular mycorrhiza; Glomus; leguminous; revegetation; rhizobacteria; rhizosphere; soil enzymes.

1 Introduction

Native forests have gradually given place to agricultural fields and pastures. In many cases, the inappropriate soil use leads to extensive degraded areas, resulting in loss of biodiversity and soil fertility (García et al., 1997).

The restoration of suitable vegetation is known to improve the soil chemical, physical, and biological properties (Skujins and Allen, 1986). Symbiotic microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and Rhizobium are key elements for plant reestablishment under xeric and low-fertility environments (Herrera et al., 1993; Requena et al., 1997; Alguacil et al., 2005). In particular, the successful re-establishment of native plants in degraded soil may be limited due to low density of AMF propagules (Requena et al., 2001).

The interest in using AMF and Rhizobium to help the reestablishment of leguminous in desertified ecosystems is increasing (Herrera et al., 1993; Requena et al., 2001). Nitrogen inputs derived from biological N₂-fixation (BNF) may be critical for plant development in degraded areas (Barea et al., 1992). In addition, mycorrhizal symbioses play an essential role in plant phosphorus uptake (Caravaca et al., 2002). AMF are known to enhance nodulation and N fixation in legumes. Mycorrhizal and Rhizobium often act synergistically on mineral nutrition and plant growth. The increased P uptake conferred by AMF symbiosis is beneficial for BNF, a highly energy-demanding process as ATP (Barea et al., 1992).

Multimicrobial interactions including not only AMF and Rhizobium but also other plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have also been experienced (Requena et al., 1997). Such PGPR operate several mechanisms, including N₂-fixation, P solubilization, and phytohormone production (Vessey, 2003).

Soil properties that rapidly answer when a particular conservation practice or soil management is carried out are interesting to ascertain whether that environment is sustainable or not (Bolinder et al., 1999). Early indicators of ecosystem stress may function as “sensors” whose perturbation may sensitively warn us about soil degradation as compared to other classical and slowly changing soil properties, such as organic matter (Dick, 1994). Soil enzymes are main candidate “sensors”, since they integrate information on both soil microbial status, and physical-chemical conditions (Aon and Colaneri, 2001).

Plants and microorganisms (e.g. bacteria and fungi) are the main sources of soil enzymes. Some enzymes are directly related to microorganisms. For instance, dehydrogenase activity is mainly in the bacterial plasma membrane or fungal mitochondrial membranes. Other enzymes are synthesized and secreted extracellularly. Microbially-secreted enzymes may take part of the soil matrix as extracellular enzymes, also called abiotic enzymes (Sinsabaugh, 1994).

Extracellular soil enzyme activities may be directly regulated via increased production and secretion by microorganisms (Aon et al., 2001). On the other hand, soil physical-chemical conditions may indirectly affect soil enzyme activities. Organic carbon, total nitrogen, available P, pH, ionic strength, and water content, are decisive for modulating soil enzyme activities (Sinsabaugh, 1994). In addition, they are also sensitive to perturbations caused by microbial inoculation (Mawdsley and Burns, 1994; Naseby and Lynch, 1997). In this context, soil enzyme activities have potential to provide a unique integrative biological assessment of soils because of their relationship to soil biology, easiness to measure, and rapid response to changes in soil management (Bandick and Dick, 1999). Moreover, soil enzymes play essential roles in the biogeochemical cycles. Soil organic matter quality generally affects

enzymes related to C cycle. By its turn, enzymes related to P and N cycles are affected by availability of these nutrients (Sinsabaugh, 1994).

Eight soil enzymes representative of important nutrient recycling in the soil were chosen for this study. Phosphatases play a key role in phosphorous mineralization, and P cycling. They are ubiquitous in soil and catalyze the hydrolysis of organic phosphomonoester to inorganic phosphorous (Alef and Nannipieri, 1995). Dehydrogenase activity was originally used for measuring soil microbial respiration *in situ* (Casida et al., 1964). Asparaginase activity is bound to cell constituents and reflects soil organic matter content (Sowden, 1958). As a result of its activity, mineral N is released from organic forms in the soil organic matter. Glutaminase is among the amidohydrolases that also supplies mineral nitrogen to plants by hydrolyzing mineral N from organic forms (Alef and Nannipieri, 1995). Urease activity in soil also plays a role at N cycle and seems correlated with microbial activity (Conrad, 1942). Amylase and cellulase are some of the important soil enzymes that are partially responsible for the decomposition of plant litter (Pancholy and Rice, 1973).

The fraction of soil carbohydrates extractable with hot water (HWCH) was also estimated. Soil carbohydrates usually represent only 10-20% of organic matter, and are organic constituents most closely involved in soil aggregation (Sparling and Cheshire, 1985). Moreover, they are an important source of energy for soil microbial activity (Insam, 1996). Ball et al. (1996) found that HWCH fraction contained more extracellular microbial polysaccharides involved in soil aggregates stabilization. Thus, the HWCH fraction may be a good indicator of soil organic matter quality, relevant to the preservation of good soil physical conditions.

The aim of this work was to assess some enzyme activities and HWCH in the rhizosphere of four indigenous woody leguminous trees used in reforestation programs in Brazil, when associated with four AMF species and rhizobacteria.

2 Material and Methods

2.1 Growth Substrate

Samples from the superficial layer (0-20 cm) of a soil classified as Quartzipsamment was mixed with river sand (3:1 v/v). After homogenization, the substrate was fumigated with methyl bromide per 1 week and kept standing per one more week, for removal of the residues of the fumigant. The soil chemical analysis showed the following characteristics: pH (CaCl₂) 4.5; C 11.04 g dm⁻³; P 2.0 mg dm⁻³; Ca²⁺ 1.3 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ 0.78 cmol_c dm⁻³; K⁺ 0.05 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ 0.57 cmol_c dm⁻³.

2.2 Plants and microbial treatments

Four species of indigenous wood legume employed in reforestation programs were tested, being three nodulating species of the Mimoseae family: Anadenanthera colubrina, Enterolobium contortisiliquum and Parapiptadenia rigida and one non-nodulating species of the Caesalpinoideae family: Peltophorum dubium. These plants were elected for the study due to its importance in the initial stages of vegetal succession, being classified as early secondary (A. colubrina and P. rigida) and late secondary (E. contortisiliquum and P. dubium) (Zangaro et al., 2003).

The mycorrhizal fungi were Glomus clarum, Glomus etunicatum, Glomus intraradices or Gigaspora margarita. The mycorrhizal inoculum of each species was multiplied previously in *Brachiaria decumbens* and consisted of spores, hyphae and colonized root fragments. Thirty days after germinated in trays containing washed sand, one seedling was transplanted onto the growth substrate in pots containing 2 kg of the substrate. Five grams of the corresponding AMF inoculum was added to a hole in the center of pots, just before the seedling transplantation. The control pots were supplemented with a filtrate of natural soil to restore the indigenous microbial community, except AMF. All plants were grown under nursery conditions and were watered as necessary with tap water. Plants also received weekly 10 mL of the Hewitt's Nutritive Solution for legumes, with reduced content of P (1/5).

The strains of rhizobacteria were acquired from the collection of the Embrapa/Agrobiologia. Two strains of Rhizobium sp. were used for each noduliferous legume species. For Anadenanthera colubrina were used BR9001 and BR9004; for Enterolobium contortisiliquum, BR4406 and BR4407; and for Parapiptadenia rigida, BR827 and BR9002. The non-noduliferous species P. dubium was inoculated with Burkholderia sp. (LEM 6), isolated at our laboratory from *Drosera villosa* rhizosphere.

All rhizobacteria were cultivated in TY medium and grown in BOD at 28°C for 3-5 days. After growth, each strain was resuspended in 350 ml of sterile saline solution 0.85% and the O.D. (650 nm) adjusted in order to enable at least 10^{10} cells per pot. The bacterial inoculation was made one month after the transplanting.

2.3 Experimental design

Each legume species was inoculated with one of four AMF species or left uninoculated (non-mycorrhizal control), in the presence and absence of rhizobacterium. The experimental design was entirely randomized, in factorial arrangement 4x5x2 [4 tree species; five levels of AMF (4 species + control) and presence and absence of rhizobacteria], in four replications. The evaluations for each species were carried out approximately 190 days after the inoculation of rhizobacteria.

2.4 Sampling procedures

The rhizospheric soil (defined as the soil adhered to the roots) of each plant was collected 220 days after transplanting for enzymatic activity assays. The root system and the plant's shoot were also collected for determination of the plant dry weight.

2.5 Soil biochemical analyses

Acid (EC 3.1.3.2) and alkaline (EC 3.1.3.1) phosphatase activity were determined using sodium *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP, 0.05 M) as substrate (Tabatabai and Bremner, 1969). Four ml of MUB buffer (pH 6.5 and 11.0 for acid and alkaline phosphatase, respectively) and 1.0 ml of the PNPP solution were added to 1.0 g of moist soil and incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped with 1.0 ml 0.5 M CaCl₂ and 4 ml 0.5 M NaOH. The mixture was filtered through filter

paper (porosity 8 μm , density 80 g m^{-2}). The *p*-nitrophenol (PNP) formed was determined spectrophotometrically at 398 nm. Controls were made in the same way, although the PNPP solution was added after the CaCl_2 and NaOH, just before the filtration.

Dehydrogenase activity was determined according to Casida et al. (1964). Five g of moist soil was incubated with 5 ml of 1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) for 24 h at 37°C. The TPF (2,3,5-triphenyl formazan) formed was extracted with 10 ml of methanol by shaking vigorously for 1 min and centrifuged at 3400 rpm for 10 min. TTF was measured spectrophotometrically at 485 nm.

Urease hydrolysing activities (EC 3.5.1.5) were determined in 0.05 M THAM buffer at pH 9 and 0.2 M urea (Tabatabai and Bremner, 1972) as enzyme substrate. Nine ml of buffer and 1.0 ml of the substrate were added to 1 g of sample, and incubated at 37°C for 120 min. The enzymatic activity was determined as the NH_4^+ released in the hydrolysis reaction.

Glutaminase (EC 3.5.1.2) and asparaginase (EC 3.5.1.1) activities were determined in 0.1 M THAM buffer at pH 10; 0.5 M L-asparagine and 0.5 M L-glutamine (Frankenberger and Tabatabai, 1991) were used as enzyme substrates, respectively. Nine ml of buffer and 1.0 ml of each substrate were added to 1.0 g of sample, and incubated at 37°C for 120 min. Both activities were determined as the NH_4^+ released in the reaction.

Amylase (EC 3.2.1) and cellulase (EC 3.2.1.4) activities were measured by incubating 5 g of soil with toluene, buffer acetate-phosphate pH 5.5 and the enzyme substrate (starch 2% and of carboxymethyl cellulose 0.7%, respectively) for 24 h at 50° C. The reducing sugars produced as glucose were estimated by Prussian Blue method (Schinner and Von Mersi, 1990).

Carbohydrates were extracted according to Ball et al. (1996), with minor modifications. Soil was shaken with hot water (80°C) using a 1:5 soil: extractant ratio (w/v). The hot-water extract was centrifuged (5800 x g for 10 min) and the supernatant filtered through a 0.45- μ m membrane filter under vacuum. The carbohydrates in the filtrate were hydrolyzed with 12 M H₂SO₄ and 1% timol (3-hydroxy-4-isopropyl toluene) dissolved in ethanol. The mixture was shaken well, covered with aluminum sheet, and placed in boiling water bath for 35 minutes. After cooling the absorbance was read at 490 nm.

2.6 Statistical analysis

Plant species, mycorrhizal and bacterial effects or their interactions on the variables were tested by ANOVA. The significant effects were submitted to Tukey's test at P<0.05 level. Statistical procedures were carried out with the software SAS for Windows release 6.11 (SAS, 1991). In addition, all enzyme activities and HWCH data were submitted to principal component analysis (PCA) in order to find the most discriminating treatment effects.

3 Results

3.1 Plant growth

The plant growth was more evident for the factor AMF (P<0.001) (Figure 1A). E. contortisiliquum and P. dubium reached greater biomasses in the presence of G. clarum, followed by G. margarita. Although A. colubrina and P. rigida had produced

less biomass than the first two species, they also benefited from the symbiosis with G. clarum and G. margarita. All species associated to G. etunicatum and G. intraradices did not significantly differ from the non-AMF control plants.

There was no significant effect ($P < 0.05$) of rhizobacteria on plant biomasses, although there was a general tendency of greater plant biomass when inoculated with rhizobacteria. For E. contortisiliquum the significance level was 8% (Figure 1B).

3.2 Acid phosphatase

There was double interaction between AMF and rhizobacteria ($P < 0.05$) on acid phosphatase activity. In this case, all AMF stimulated the enzymatic activity in the treatments with rhizobacteria when compared to the control without AMF (Figure 2). In the absence of rhizobacteria, only G. intraradices increased the enzymatic activity in relation to the non-mycorrhizal control. The effect of rhizobacteria differed only in the non-mycorrhizal control, in which the activity was stimulated in the absence of rhizobacteria. When plants were associated with AMF this effect disappeared.

The single effect of plant species on the acid phosphatase activity was also observed ($P < 0.001$). The highest activities occurred in the rhizospheres of P. rigida ($166.6 \mu\text{g PNP g-soil}^{-1}$) and P. dubium ($164.0 \mu\text{g PNP g-soil}^{-1}$), and differed significantly from E. contortisiliquum and A. colubrina (113.2 e $118.9 \mu\text{g PNP g-soil}^{-1}$, respectively).

The interactions between species and rhizobacteria as well as between species and AMF were not significant ($P < 0.05$).

3.3 Alkaline phosphatase

There was double interaction between plant species and rhizobacteria ($P < 0.05$) and plant species and AMF ($P < 0.01$). P. rigida showed the highest activity, either in presence or absence of rhizobacteria compared to the other tree species (Figure 3A), followed by P. dubium. Regarding the rhizobacteria treatment, E. contortisiliquum showed similar alkaline phosphatase activity, irrespectively to rhizobacteria. However, the rhizobacteria increased the enzymatic activity for the others species.

In the interaction between AMF and plant species, AMF stimulated the alkaline phosphatase activity, mainly G. clarum, only in the rhizosphere of P. rigida (Figure 3B). This species also showed the highest enzyme activity in each AMF level, followed by P. dubium. In general, lower alkaline phosphatase activities, irrespectively to AMF levels, were found in the rhizospheres of E. contortisiliquum and A. colubrina.

There was no significant effect on the interaction between rhizobacteria and AMF.

3.4 Dehydrogenase

The only significative effect on dehydrogenase activity occurred in the interaction between plant species and AMF ($P < 0.001$). In this case, in the non-AMF control plants, as well in plants associated to G. etunicatum, plant species did not differ in relation to dehydrogenase activity levels (Figure 4). However, when associated to G. clarum, dehydrogenase activity increased at P. rigida rhizosphere, while A. colubrina held higher activity when associated to G. intraradices. P. dubium,

by its turn, showed lower activity when associated to G. margarita. G. clarum and G. margarita reduced the dehydrogenase activity in the rhizosphere of E. contortisiliquum, P. dubium and A. colubrina in relation to the non-AMF control or the other AMF-species associated plants. AMF levels did not affect the dehydrogenase activity in the rhizosphere of P. rigida.

3.5 Glutaminase

There was double interaction effects between plant species and rhizobacteria ($P < 0.05$). When rhizobacteria were present, there was similar glutaminase activity in the rhizosphere of all plants. However, in the absence of rhizobacteria, the activity in the rhizosphere of A. colubrina and P. dubium differed significantly, with the highest and the lowest activities, respectively (Figure 5). Rhizobacteria increased the enzymatic activity in the rhizosphere of P. dubium and E. contortisiliquum.

Concerning the single effect of AMF ($P < 0.001$) on glutaminase activity (Figure 6), G. etunicatum and G. intraradices increased the enzymatic activity in relation to that found in the presence of G. clarum and non-AMF control.

3.6 Urease

The interaction between plant species and rhizobacteria influenced urease activity ($P < 0.05$) (Figure 7). Irrespective to rhizobacteria status, the highest urease activity occurred in the A. colubrina rhizosphere, followed by P. rigida, P. dubium and E. contortisiliquum species. The rhizobacteria effect on urease activity varied between A. colubrina and P. rigida, resulting in decrease and increase, respectively.

There was also single effect of AMF on urease activity ($P < 0.05$) (Figure 6). The activity differed only in the rhizosphere of plants associated with G. intraradices and G. margarita, with the highest and the lowest activities, respectively.

3.7 Asparaginase

Likewise the other enzymes related do N cycle, the interaction between plant species and rhizobacteria also influenced the asparaginase activity ($P < 0.05$). Irrespective to rhizobacteria, P. rigida and P. dubium showed higher activities in their rhizospheres compared to A. colubrina and E. contortisiliquum (Figure 8). In the rhizosphere of P. rigida the rhizobacteria increased the enzyme activity, but this effect was not observed for the other plant species.

A single AMF effect on asparaginase activity ($P < 0.05$) was also observed (Figure 6). Among AMF treatments, only plants associated to G. intraradices and G. etunicatum increased enzymatic activity in the rhizosphere in relation to the non-AMF control plants.

3.8 Cellulase

At the interaction between AMF and rhizobacteria ($P < 0.05$) all AMF increased the cellulase activity in the rhizosphere in relation to the non-AMF control plants when also inoculated with rhizobacteria (Figure 9A). Nevertheless, considering the AMF effects when not associated to rhizobacteria, only plants associated to G. intraradices had higher activity in relation to the non-AMF control plants. By its turn, rhizobacteria increased cellulase activity only in the non-AMF control plants rhizosphere.

When considering the interaction between AMF and plant species ($P < 0.05$) (Figure 9B), the AMF in general increased the enzyme activity only in P. dubium rhizosphere in relation to the non-AMF control. In relation to plant species, E. contortisiliquum had the lowest cellulase activity in all AMF levels, even in the non-AMF control.

3.9 Amylase

The interaction between plant species and rhizobacteria affected the amylase activity ($P < 0.001$) (Figure 10A) and as a result, the highest activities were found at P. dubium rhizosphere, in both rhizobacteria levels. In general, the lower amylase activity was found at A. colubrina rhizosphere. The rhizobacteria stimulated the enzyme activity in the rhizosphere of P. dubium and A. colubrina.

In the interaction between plant species and AMF ($P < 0.01$) (Figure 10B) P. dubium generally showed higher amylase activity at all AMF levels. Except for P. dubium, the AMF generally stimulated the enzymatic activity in the rhizosphere of all plants. This effect was still more pronounced by G. etunicatum and G. intraradices in the E. contortisiliquum and A. colubrina rhizospheres.

At the interaction between AMF and rhizobacteria ($P < 0.001$) (Figure 10C), the rhizobacteria stimulated the enzymatic activities in the non-AMF plants rhizospheres. When rhizobacteria were inoculated, the amylase activity differed only in the rhizospheres of plants associated with G. intraradices and G. margarita, the highest and the lowest activities, respectively. When rhizobacteria were not inoculated, the amylase activity increased in all AMF-inoculated plant rhizospheres.

3.10 Carbohydrates

The hot water-soluble carbohydrates (HWCH) were influenced in the interaction between AMF and rhizobacteria ($P < 0.01$) (Figure 11A). In the presence of rhizobacteria, the greater HWCH content was observed in the non-AMF control, which differed significantly from the treatment with G. etunicatum and G. margarita. Conversely, when plants were not inoculated with rhizobacteria, the non-AMF control plants showed the lowest HWCH contents in their rhizospheres in relation to G. clarum-associated plants. The rhizobacteria stimulated the HWCH content only in the non-AMF control plant rhizospheres.

At the interaction between AMF and plant species ($P < 0.01$) (Figure 11B), in general all AMF stimulated the HWCH in the rhizosphere of P. dubium in relation to the remaining plant species. Depending on the plant species, the AMF either decreased (e.g. E. contortisiliquum associated to G. margarita) or stimulated (e.g. P. dubium associated to G. clarum) the HWCH in the rhizosphere.

3.11 PCA analysis

When all data were submitted to PCA analysis, independently of the inoculation with AMF or rhizobacteria, the four plant species grouped differently. From these data, it can be seen that the plant species showed more effects on enzymatic activities than microbial inoculations (Figure 12). In spite of E. contortisiliquum and A. colubrina had formed two groups of points separated apart, P. dubium and P. rigida were more closer, indicating rhizospheres more similar biochemically.

4 Discussion

4.1 Plant growth

Among the AMF, only G. clarum and G. margarita were effective in improving plant growth. In fact, previous works have demonstrated that not all AMF are effective in improve plant growth, what is attributed to a functional compatibility between fungus/host in the symbiosis (Smith and Read, 1997). Nevertheless, AMF are essential in many ecosystems, improving plant productivity (Allen et al., 1995; Requena et al., 2001). The mechanism by which plant benefit from AMF is based on the increase of soil volume explored due to external hyphae, resulting in more nutrient uptake. Moreover, AMF may also improve root system development and produce plant-growth promoting substances (Álvarez, 1991).

AMF symbiosis especially benefit nitrogen-fixing plant species, given that essential nutrients for an effective BNF and plant growth, like P, are more efficiently uptaken (Herrera et al., 1993). Moreover, non-nodulating species are also dependent on AMF to a better adaptation to anthropically altered environments (Caravaca et al., 2002). Although not significative at $P < 0.05$, the rhizobacteria tended to improve plant development, even in the non-noduliferous species P. dubium. In the case of E. contortisiliquum, the rhizobia strains (BR4406 and BR4407) improved the plant growth if considered the significance level of $P = 0.08$. Synergistic effect between rhizobia and AMF in relation to plant growth has been reported (Duponnois and Plenchette, 2001).

4.2 Interactions between AMF and rhizobacteria and effects on enzyme activity

The enzymes affected in this interaction were acidic phosphatase, cellulase and amylase. In general, AMF stimulated acidic phosphatase and cellulase, mainly when associated with rhizobacteria. The amylase activity contrasted between the treatments with G. intraradices and G. margarita, also when associated with rhizobacteria. When plants were not inoculated with rhizobacteria, all AMF stimulated the amylase activity, while cellulase and acid phosphatase were stimulated only in the treatments with G. intraradices. At the non-AMF control plants, the rhizobacteria decreased the acidic phosphatase activity, but increased cellulase and amylase.

Interactions comprising AMF and rhizobacteria in the rhizosphere usually ends in unpredictable results. For example, rhizobacteria can either stimulate or inhibit AMF (Azcón, 1989). By its turn, AMF can also affect rhizobacteria negatively or positively (Wamberg et al., 2003). Specific interactions between AMF and PGPR have been also described (Paulitz and Linderman, 1989). Nevertheless there is no available data in the literature about enzymatic activity in the rhizosphere of plants under tripartite symbioses.

The degradation of organic macromolecules implies the synergistic action among several microbial populations interacting themselves. For example, interactions between fungi and bacteria may exert effects on cellulosic (Lang et al., 1997) and amylasic activities. Nevertheless, the acid phosphatase activity cannot be attributed only to rhizospheric microorganisms, because plants also produce and release this enzyme into rhizosphere (Alef and Nannipieri, 1995). AMF effects on acid phosphatase activity have shown to depend on the plant-AMF interaction (Rao and Tarafdar, 1993), resulting in different patterns of enzymatic activity. For example,

Caravaca et al. (2003) observed a decrease on acid phosphatase activity in AMF-associated plants. Joher and Jakobsen (1995) concluded that the acid phosphatase activity did not change as a direct AMF effect, but it did due to the reduced amount of exudates in the AMF-plants. Although we did not quantify the root exudates, it is known that microorganisms such as rhizobacteria and AMF may change the plant biochemistry. This effect is also expected to reflect on some enzyme activities in the rhizosphere. In fact, rhizobacteria and AMF together stimulated the acid phosphatase activity in the rhizosphere. Nevertheless, when rhizobacteria were not inoculated, only G. intraradices stimulated the enzymatic activity.

Although plants associated to G. clarum and G. margarita had grown more than those associated to G. intraradices and G. etunicatum, there was no effect on enzymatic activity, which were generally stimulated in the treatments with G. intraradices. Probably the different AMF causes different physiological effect on plant and consequently on enzymatic activity in the rhizosphere. For example, G. intraradices is known for its internal sporulation in host plant. This behavior could cause different physiological effect on plant as compared to the other AMF.

4.3 Plant species effects on enzymatic activity

The single plant species effects on enzymatic activity occurred only for acid phosphatase and were stimulated in the rhizosphere of P. rigida and P. dubium. The microbial composition is different according to plant species. Consequently, the enzymatic activity is also expected to be different (Kourtev et al., 2003). It may be expected that plants expressing higher enzymatic activity in their rhizospheres possesses greater adaptative advantage than those with less activity. In the case of

in P. rigida and P. dubium rhizospheres, independently of the symbiont (either AMF or rhizobacteria), the higher acidic phosphatase activity could be a mechanism of ecophysiological adaptation.

4.4 Interactions between AMF and plant species on enzymatic activities

Such effect occurred for alkaline phosphatase, dehydrogenase, cellulase and amylase, i.e., the enzymatic activity varied between plant species depending on the AMF associated and vice-versa. The highest alkaline phosphatase activity was found in P. rigida and P. dubium rhizospheres, similarly to acid phosphatase activity. When plants were inoculated with AMF, only P. rigida had an increase on alkaline phosphatase activity. Apparently E. contortisiliquum, P. dubium and A. colubrina have an intrinsic level of alkaline phosphatase activity in their rhizospheres, which is not changed due to AMF. The lowest activities in A. colubrina and E. contortisiliquum rhizospheres, independently of AMF species or status, is related to different effects each plant exert on soil properties. For example, soil pH strongly affects phosphatase activities (Dick et al., 2000). This effect may be direct or even indirect, given that pH affects the availabilities of inhibitor or activator of soil enzymes. Phosphatases activities, in particular, depend on the chemical P status in the soil (Dodd et al., 1987), particularly organic phosphates that are the substrate for phosphatases (Tarafdar and Marschner, 1994). On the other hand, mineral P may also affect phosphatase activity, in a product inhibition fashion (Abd-Alla, 1994).

Since alkaline phosphatases are originated from microorganisms (Dick et al., 1983), it is expected that plants with higher alkaline phosphatase activities in the

rhizosphere also enable higher biological activity. In spite of this, the alkaline phosphatase did not correlate with dehydrogenase activity.

According to Tabatabai and Bremner (1969), the acid phosphatase activities prevail in acidic soils, as observed in this experiment, while the same occur for alkaline phosphatase in alkaline soils. This suggests that soil pH exert some control on synthesis, release and stability of phosphatases.

Except for P. rigida, the more effective AMF on plant growth, G. clarum and G. margarita, decreased the dehydrogenase activity. Conversely, Alguacil et al. (2005) showed an increase on dehydrogenase activity in the rhizosphere of AFM-associated plants. Moreover, the dehydrogenase activity seems to be related to the vegetation type and consequently to the soil organic matter quality (Pancholy and Rice, 1973). Dehydrogenase activity in the soil is related to the live cells, since free dehydrogenases are not expected to be found in the soil (Frankenberger and Dick, 1983). The dehydrogenase activity would be expected to be higher in the rhizospheres of more developed plants as a result of greater root exudation and consequently greater microbial activity. Nevertheless, it must be considered that the exudates differ qualitatively in each plant species and also affects the associated soil microbial community. Indeed, the higher amount of HWCH was found in the P. dubium rhizosphere, mainly when associated with AMF. In spite of this, there was no increase of microbial activity as measured by dehydrogenase activity.

P. dubium was the plant species that showed the highest amylase activity but AMF did not affect the activity. In general, AMF stimulated the amylase activity only in the rhizosphere of the other plant species. E. contortisiliquum had the lowest cellulase activity, independently of AMF species or status. Mycorrhizal plants are physiologically different from non-mycorrhizal plants, including mineral composition,

hormonal status, C allocation pattern, etc. (Smith et al., 1994). As a result, different exudates compositions are also expected, what in turn affects quantitative- and qualitatively the microbial composition in the rhizosphere (Linderman, 1992). Since microorganisms control the enzyme production, secretion and consequently their activity in the soil, the different AMF effects on each plant species may have reflected the microbial community composition and consequently amylase, cellulase, acidic phosphatase and dehydrogenase activities. The initial degradation of a number of organic compounds in the soil is reliant on specific enzymes, produced by only specific microbial species. Under this view, plant species and AMF associations may play an important role on stimulating some cycles in the soil, resulting in more organic matter turnover and consequently nutrient mineralization in the rhizosphere. Plants possessing more biochemically active rhizospheres would be expected to be more able to adapt to poor environments in terms of nutrients availability due to its ecophysiological adaptation capacity.

Although there is no specificity in relation to AMF infection in the host plant, the colonization rates and the effectiveness of the association differ between fungus-host (Smith and Read, 1997). This effect was not evident only for plant growth, but also for some enzymatic activities in the plant rhizospheres.

4.5 AMF effects on enzymatic activities

The single AMF effect occurred only for enzymes related to N cycle: glutaminase, asparaginase and urease. G. intraradices generally stimulated the enzyme activities, in spite of this AMF have not improved plant growth. The non-mycorrhizal rhizospheres generally had the lowest enzymatic activities. In the case of

urease only G. intraradices stimulated its activity in relation to G. margarita. As has been shown above, each AMF species can affect differently the enzymatic activities in the rhizosphere.

Nitrogen is one of the main nutrients demanded by plants and is generally in short supply in degraded areas or low-fertility soils (Delgado, 2002). Enzymatic activities assessments are tools for an early indication of plant ability in mobilizing N in its rhizosphere. The increased activities of urease, asparaginase and glutaminase, depending on the AMF, may be an extra advantage these endophytes bring to their hosts. There are no evidences that AMF secretes these enzymes (Alguacil et al., 2005). Consequently, the increased activity must be derived from either changes in plant physiology or microbial community.

4.6 Interactions between plant species and rhizobacteria on enzymatic activities

The effect of plant species on glutaminase, asparaginase, urease, amylase and alkaline phosphatase activities varied according to rhizobacteria inoculation or not. Although many works have assessed the enzymatic activity in the rhizosphere (Reddy et al., 1987) no one have assessed the effects of rhizobacteria on such activities.

The success of microbial inoculants such as PGPR in plants depends on intricate interactions with other soil microorganisms and the host plant (Garbaye, 1994). These interactions may also involve physiological alterations in plant host and also in its rhizosphere. As observed in this work, depending on the host, the inoculation of rhizobacteria sometimes stimulated some enzymatic activities. Plant effects on physical and chemical properties in its rhizosphere may affect the

rhizobacteria effects. For example, pH, water potential, O₂ may be changed according to exudation pattern of each plant species (Revsbech et al., 1999). Moreover, the rhizobacteria themselves can also cause physiological changes in plants causing subsequent effects in the rhizosphere. As a result, changes in enzymatic activities were sometimes observed when plants were inoculated with rhizobacteria. When inoculating Rhizobium in noduliferous plant species, a change in enzymatic activities in the rhizosphere would not be surprising, because the plant physiological status is expected to change when associated with these N-fixing bacteria. Nevertheless, even in the non-noduliferous plant, P. dubium, the inoculation with the rhizobacteria LEM B6 stimulated the activity of glutaminase, amylase and alkaline phosphatase.

Despite some rhizobacteria effect on enzymatic activity, the most marked effects occurred for plant species. Asparaginase, amylase and alkaline phosphatase were stimulated in the rhizospheres of P. dubium and P. rigida. The first species is non-noduliferous, while the second did not nodulated even when inoculated with Rhizobium strains. A. colubrina markedly highlighted in urease activity, followed by P. rigida and P. dubium. From this, it can be inferred that each plant species may affect differentially the enzymatic activity in its rhizosphere what can reflect on plant ability in mobilize nutrients.

The enzymatic activity in plant rhizosphere may be modulated either directly by plant or indirectly by microorganisms. For instance, some plants have high urease activity in the rhizosphere (Frankenberger and Tabatabai, 1982). On the other hand, plants may also change the microbial community (Kourtev et al., 2003) and consequently some enzyme activities. Given that nutrients are mainly uptaken from soil in a mineral form, it is not surprising that plants could modulate the enzymatic

activities in the rhizosphere (directly or indirectly) in order to mobilize the organic forms of such nutrients (Morgan et al., 2005).

4.7 Effects on HWCH

According to Sparling et al. (1998), the HWCH are correlated with microbial biomass. Fischer (1993) also found close correlation between CO₂ evolution and HWCH. In fact, the HWCH are mainly originated from microorganisms (Nacro et al., 2005), what suggest higher HWCH content would represent higher microbial activity as well. When comparing the AMF effect in presence of rhizobacteria, a decrease occurred in the treatments with G. etunicatum and G. margarita. The only rhizobacteria effect occurred in the non-AMF treatments, in which higher HWCH was found in the rhizosphere of rhizobacteria-inoculated plants. In this case, the higher HWCH found may be due the inoculated rhizobacteria. On the other hand, when plants were associated to G. etunicatum and G. margarita, the HWCH production might have been restricted. It is known that AMF may demand up to 10-20% of total plant photoassimilates (Johnson et al., 2002) and compete with the other microbial community in the rhizosphere.

Comparing the plant species in each AMF level, P. dubium generally resulted in higher HWCH, when associated to AMF, what emphasizes the AMF role in helping plant establishment and ecosystem stability. This might be considered an advantage in using this plant species when associated to AMF for degraded areas reclamation. Considering that higher HWCH may result in higher soil aggregates stability (Haynes and Swift, 1990), P. dubium associated to AMF may contribute to a more stable environment in relation to soil erosion. In addition, given that the HWCH are

correlated to microbial biomass and soil particle aggregation, might be used as an extra soil-quality indicator.

4.8 Multivariate analysis

When analyzing the enzyme activity separately in the different interactions among plant species, AMF and rhizobacteria inocula, there was no clear tendency. Each enzyme activity seemed to be different for each plant species and was sometimes modulated by microbial inoculum. Nevertheless, when these data were submitted to a PCA, it could be seen that A. colubrina had the most discrepant enzymatic activity. Nevertheless, P. dubium and P. rigida seemed to have more similarities in terms of enzymatic activity in the rhizosphere. This analysis emphasizes that the more evident effect on enzymatic activity in the rhizosphere was due to plant species than the microbial inocula.

4.9 Conclusions

The enzymatic activities showed to be sensitive to plant species and the inoculated microorganisms. The mycorrhizal symbiosis that most improved the plant growth not necessarily stimulated the enzymatic activities in the rhizospheres. From this, it can be inferred that different AMF affect differentially plant physiology and consequently the enzymatic activities in the rhizospheres. Depending on the plant species, the double inoculation of AMF and rhizobacteria stimulated some enzyme activities. Although all plant species benefited strongly from G. clarum and G. margarita, in general, P. dubium showed a more biochemically active rhizosphere

when associated with AMF and rhizobacterium. Hence, this plant species seems to show a better capacity for ecophysiological adaptation in relation to the others. In this case, this could be an additional advantage for this plant when used for reforestation of degraded and/or low fertility soils.

Acknowledgements

We greatly thank Dr. Rosa Pitard (Embrapa Agrobiologia) for providing the Rhizobium strains; Dr. Arnaldo Colozzi-Filho (IAPAR Londrina) and Dr. Elke J.B.N. Cardoso for providing the initial mycorrhizal isolates and M.Sc. Alba Lúcia Cavalheiro (UEL/CCB/BAV) for supplying the plant seeds. This project was partially granted by Fundação Araucária (Project Number CPG/UEL 03937).

References

ABD-ALLA, M.H. Use of organic phosphorus by Rhizobium leguminosarum biovar viceae phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 18, 216-218, 1994.

ALEF, K., Nannipieri, P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, 576 pp, 1995.

ALGUACIL, M.M., CARAVACA, F., ROLDÁN, A. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean degraded environment. *Biology and Fertility of Soils* 41, 59-68, 2005.

ALLEN, E.B., ALLEN, M.F., HELM, D.J., TRAPPE, J.M., MOLINA, R., RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170, 47-62, 1995.

ÁLVAREZ, J. Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las micorrizas. In: Olivares, J., Barea, J.M. *Fijación y movilización biológica de nutrientes. Fijación de N y Micorrizas*. CSIC, Madrid, Spain, pp. 247-259, 1991.

AON, M.A., CABELLO, M.N., SARENA, D.E., COLANERI, A.C., FRANCO, M.G., BURGOS, J.L., CORTASSA, S. I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18, 239-254, 2001.

AON, M.A, COLANERI, A.C. II Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18, 239-254, 2001.

ALGUACIL, M.M., CARAVACA, F., ROLDÁN, A. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean degraded environment. *Biology and Fertility of Soils* 41, 59-68, 2005.

AZCÓN, R. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 639-644, 1989.

BALL, B.C., CHESHIRE, M.V., ROBERTSON, E.A.G., HUNTER, E.A. Carbohydrate composition in relation to structural stability, compactibility and plasticity of two soils in a long-term experiment. *Soil and Tillage Research* 39, 1647-1653, 1996.

BANDICK, A.K., DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1471-1479, 1999.

BAREA, J.M., ACZÓN, R., AZCÓN-AGUILAR, C. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Methods in Microbiology* 24, 391-416, 1992.

BOLINDER, M.A., ANGERS, D.A., GREGORICH, E.G., CARTER, M. R. The response of soil quality indicators to conservation management. *Canadian Journal of Soil Science* 79, 37-45, 1999.

CARAVACA, F., BAREA, J.M., FIGUEROA, D., ROLDÁN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. sylvestris through changes in soil biological and physical parameters. *Applied Soil Ecology* 20, 107-118, 2002.

CARAVACA, F., FIGUEROA, D., ROLDÁN, A., AZCÓN-AGUILAR, C. Alteration in rhizosphere soil properties of afforested Rhamnus lycioides seedlings in short-term response to mycorrhizal inoculation with Glomus intraradices and Organic Amendment. *Environmental Management* 31, 412-420, 2003.

CASIDA JR., L.E., KLEIN, D.A., SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98, 371-376, 1964.

CONRAD, J.P. The occurrence and origin of urease like activities in soils. *Soil Science* 54, 367-380, 1942.

DELGADO, J.A. Quantifying the loss mechanisms of nitrogen. *Journal of Soil and Water Conservation* 57, 389-398, 2002.

DICK, R.P., JUMA, N.G., TABATABAI, M.A. Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. *Soil Science* 136, 19-25, 1983.

DICK, R.P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. *Defining soil quality in a sustainable environment*. Soil Society of America, Madison, pp.107-124, 1994.

DICK, W. A., CHENG, L., WANG, G. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1915-1919, 2000.

DOOD, J.C., BURTON, C.C., BURNS, R.G., JEFFRIES, P. Phosphatase-activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 107, 163-172, 1987.

DUPONNOIS, R., PLENCHETTE, C., BÂ, A.M. Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with G. aggregatum in Senegal. *European Journal of Soil Biology* 37, 181-186, 2001.

FISCHER, T. Einflub von Winterweizen und Winterroggen in Frchfolgen mit unterschiedlichem Getreideanteil auf die mikrobielle Biomasse und jahreszeitliche Kohlenstoffdynamik des Bodens. *Ach Acker Pflanzenbau Bodenkd* 37, 181-189, 1993.

FRANKENBERGER, W.T., TABATABAI, M.A. Amidase and urease activities in plants. *Plant Soil* 64, 153-166, 1982.

FRANKENBERGER, W. T., DICK, W. A. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science Society of America Journal* 47, 945 - 951, 1983.

FRANKENBERGER, W.T., TABATABAI, M.A. Asparaginase activity of soils. *Biology and Fertility of Soils* 11, 6-12, 1991.

GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128, 197-210, 1994.

GARCÍA, C., ROLDÁN, A., HERNÁNDEZ, T. Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. *Journal of Environmental Quality* 26, 285-291, 1997.

HAYNES, R.J., SWIFT, R.S. Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *Journal of Soil Science* 41, 73-83, 1990.

HERRERA, M.A., SALAMANCA, C.P., BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 129-133, 1993.

INSAM, H. Microorganism and humus in soils. In: Picolo, A., (Eds), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* Elsevier, Amsterdam, pp 265-292, 1996.

JOHNSON, D., LEAKE, J.R., OSTLE, N., INESON, P., READ, D.J. In situ (CO₂)-C-13 pulse labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytologist* 153, 327-334, 2002.

JONER, E.J., JAKOBSEN, I. Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 1153-1159, 1995.

KOURTEV, P.S., EHRENFELD, J.G., HÄGGBLUM, M. Experimental analysis of the effect of exotic and native species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 895-905, 2003.

LANG, E., ELLER, G., ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microbial Ecology* 34, 1-10, 1997.

LINDERMAN, R.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G., (Eds), *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Madison, ASA Special Publication, 65-77, 1992.

MAWDSLEY, J.L., BURNS, R.G. Inoculation of plants with *Flavobacterium* P25 results in altered rhizosphere enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 871-882, 1994.

MORGAN, J.A.W., BENDING, G.D., WHITE, P.J. Biological cost and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56, 1729-1739, 2005.

NACRO, H.B., LARRÉ-LARROUY, M.C.; FELLER, C.; ABBADIE, L. Hydrolysable carbohydrate in tropical soils under adjacent forest and savanna vegetation in Lamto, Côte d'Ivoire. *Australian Journal of Soil Research* 43, 708-711, 2005.

NASEBY, D.C., LYNCH, J.M. Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbation caused by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 1353-1362, 1997.

PANCHOLY, S.K., RICE, E.L. Soil enzymes in relation to old field succession: amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease. *Soil Science Society of America* 37, 47-50, 1973.

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

RAO, A.V., TARAFDAR, J. C. Role of VAM fungi in nutrient uptake and growth of clusterbean in na arid soil. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 7, 275-280, 1993.

REDDY, G.B., FAZA, A., BENNETT JR., R. Activity of enzymes in rhizosphere and non-rhizosphere soils amended with sludge. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 203-205, 1987.

REQUENA, N., TORO, J.M., BAREA, J.M. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist*. 136, 667-677, 1997.

REQUENA, N., PÉREZ-SOLIS, E., AZCÓN-AGUILAR, C., JEFFRIES, P., BAREA, J.M. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 495-498, 2001.

REVSBECH, N.P., PEDERSEN, O., REICHARDT, W. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 29, 379-385, 1999.

SAS. The Statistical Analysis System. Procedure guide for personal computers. Release 6.11 5th ed. Cary, USA. 649 pp, 1991.

SCHINNER, F., VON MERSI, W. Xylanase-, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 511-515, 1990.

- SINSABAUGH, R.L. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17, 69-74, 1994.
- SKUJINS, J.; ALLEN, M.F. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *Mircen Journal* 2, 161-176, 1986.
- SMITH, S.E., GIANINAZZI-PEARSON, V., KOIDE, R., CAINERY, J.W.G. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. In: Robson, A. D., Abbott, L.K., Malajczuk, N. *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 103-113, 1994.
- SMITH, S.E., READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd (Eds). Academic, San Diego, 605 pp, 1997.
- SOWDEN, F.J. The forms of nitrogen in the organic matter of different horizons of soil profiles. *Canadian Journal of Soil Science* 38, 147-154, 1958.
- SPARLING, G.P., CHESHIRE, M.V. Effect of periodate oxidation on the polysaccharide content and microaggregate stability of rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Plant and Soil* 88, 113-122, 1985.
- SPARLING, G.P., VOJVODIC-VUKOVIC, M., SCHIPPER, L.A. Hot-water soluble C as a simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1469-1472, 1998.
- TABATABAI, M.A., BREMNER, J.M. Use of *p*-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1, 301-307, 1969.
- TABATABAI, M.A., BREMNER, J.M. Assay of urease activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 4, 479-487, 1972.
- TARAFDAR, J.C., MARSCHNER, H. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 387-295, 1994.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586, 2003.

WAMBERG, C., CHRISTENSEN, S., JAKOBSEN, I., MÜLLER, A.K., SORENSEN, S.J. The mycorrhizal fungus (Glomus intraradices) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (Pisum sativum). *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1349-1357, 2003.

ZANGARO, W., NISIZAKI, S.M.A., DOMINGOS, J.C.B., NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and sucessional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19, 315-324, 2003.

Fig. 1. (A) Effect of AMF on total dry weight (g) of woody legume species. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). Control (■); G. clarum (▨); G. etunicatum (▩); G. intraradices (▧); G. margarita (▥). (B) Effect of rhizobacteria on total dry weight (g) of woody legume species. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 10.02).

Fig. 2. AMF and rhizobacteria effects on acid phosphatase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). CO control, GC Glomus clarum, GE Glomus etunicatum, GI Glomus intraradices, GM Gigaspora margarita. * indicates significant effect of rhizobacterium in each AMF level. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 10%).

Fig. 3. (A) Effects of woody legume species and rhizobacteria on alkaline phosphatase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b,c,d and x,y,z compare woody legume species effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each woody legume species. (B) Woody legume species and AMF effects on alkaline phosphatase activities. In each AMF level, means followed by the same letter do not differ in relation to plant species (Tukey $P < 0.05$). Vertical bars represent the LSD (Tukey $P < 0.05$) to compare the AMF effect in each plant species. Control (■); G. clarum (▨); G. etunicatum (▩); G. intraradices (▧); G. margarita (▥). (Coefficient of variation = 23%).

Fig. 4. Woody legume species and AMF effects on dehydrogenase activities. In each AMF level, means followed by the same letter do not differ in relation to plant species (Tukey $P < 0.05$). Vertical bars represent the LSD (Tukey $P < 0.05$) to compare the AMF effect in each plant species. Control (■); G. clarum (▨); G. etunicatum (▩); G. intraradices (▧); G. margarita (▥). (Coefficient of variation = 3.3%).

Fig. 5. Woody legume species and rhizobacteria effects on glutaminase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a and x,y compare woody legume species effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each woody legume

species. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 12.8%).

Fig. 6. AMF effects on glutaminase, asparaginase and urease activities. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). Control (■); *G. clarum* (▨); *G. etunicatum* (▩); *G. intraradices* (▧); *G. margarita* (▥).

Fig. 7. Woody legume species and rhizobacteria effects on urease activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b,c,d and w,x,y,z compare woody legume species effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each woody legume species. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 15%).

Fig. 8. Woody legume species and rhizobacteria effects on asparaginase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b and x,y compare woody legume species effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each wood legume species. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 16.2%).

Fig. 9. (A) AMF and rhizobacteria effects on cellulase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b and x,y compare AMF effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each AMF level. CO control, GC *Glomus clarum*, GE *Glomus etunicatum*, GI *Glomus intraradices* GM *Gigaspora margarita*. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (B) Woody legume species and AMF effects on cellulase activities. In each AMF level, means followed by the same letter do not differ in relation to plant species (Tukey $P < 0.05$). Vertical bars represent the LSD (Tukey $P < 0.05$) to compare the AMF effect in each plant species. Control (■); *G. clarum* (▨); *G. etunicatum* (▩); *G. intraradices* (▧); *G. margarita* (▥). (Coefficient of variation = 9.8%).

Fig. 10. (A) Woody legume species and rhizobacteria effects on amylase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b and x,y compare woody legume species effects with and without rhizobacterium. * indicates significant effect of rhizobacteria in each woody legume species. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (B) Woody legume species and AMF effects on amylase activities. In each AMF level, means followed by the same letter do not differ in relation to plant species (Tukey $P < 0.05$). Vertical bars represent the LSD (Tukey $P < 0.05$) to compare the AMF effect in each plant species. Control (■); *G. clarum* (▨); *G. etunicatum* (▩); *G. intraradices* (▧); *G. margarita* (▦). (C) AMF and rhizobacteria effects on amylase activity. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$); a,b and x,y compare AMF effects with and without rhizobacterium. * indicates significant effect of rhizobacteria in each AMF level. CO control, GC *Glomus clarum*, GE *Glomus etunicatum*, GI *Glomus intraradices*, GM *Gigaspora margarita*. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (Coefficient of variation = 10.8%).

Fig. 11. (A) AMF and rhizobacteria effects on HWCH content. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). a,b and x,y compare AMF effects with and without rhizobacterium, respectively. * indicates significant effect of rhizobacteria in each AMF level. CO control, GC *Glomus clarum*, GE *Glomus etunicatum*, GI *Glomus intraradices*, GM *Gigaspora margarita*. With rhizobacterium (■); without rhizobacterium (□). (B) Woody legume species and AMF effects on alkaline phosphatase activities. Means sharing the same letter do not differ significantly (Tukey, $P < 0.05$). Vertical bars represent the LSD (Tukey $P < 0.05$) to compare the AMF effect in each plant species. Control (■); *G. clarum* (▨); *G. etunicatum* (▩); *G. intraradices* (▧); *G. margarita* (▦). (Coefficient of variation = 20.1%).

Fig. 12. Principal component analysis considering the enzymatic activities (acidic phosphatase, alkaline phosphatase, dehydrogenase, glutaminase, urease, asparaginase, cellulase and amylase) and hot water soluble carbohydrates in the rhizosphere of each plant species for each combination of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria inoculation ($n=4$).

Figure 1

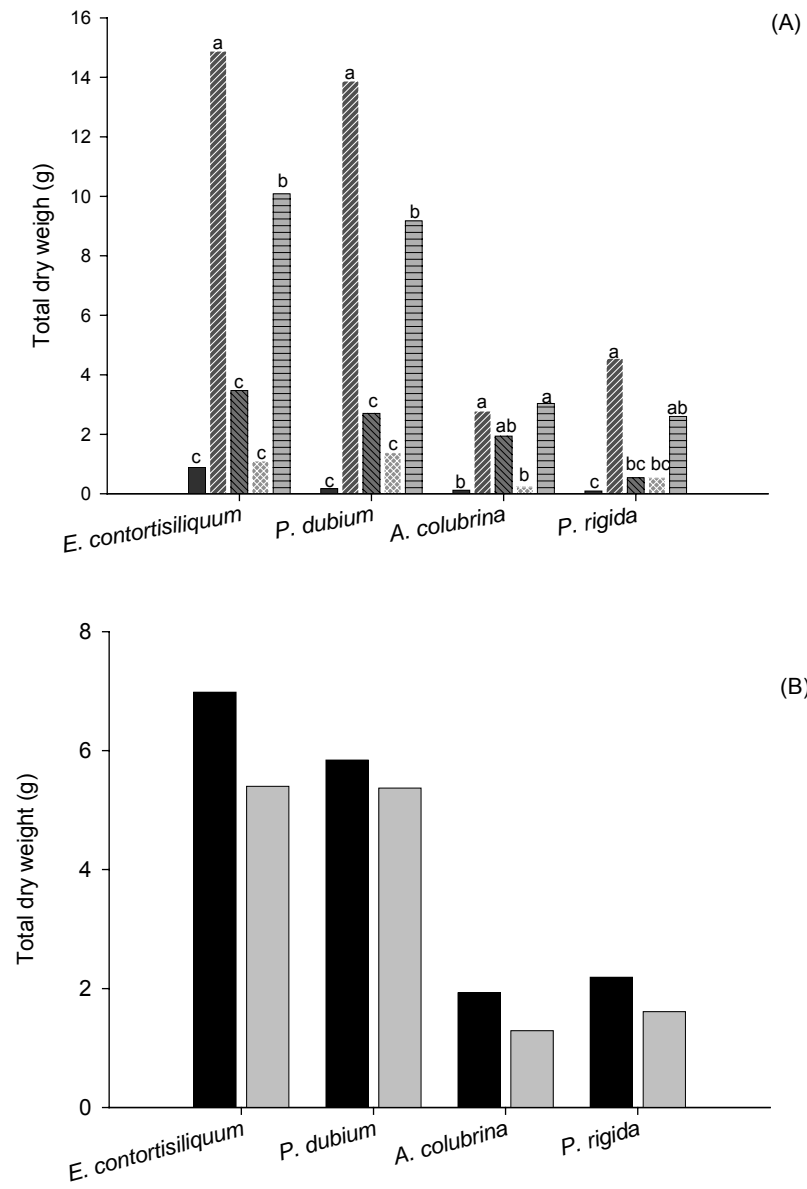


Figure 2

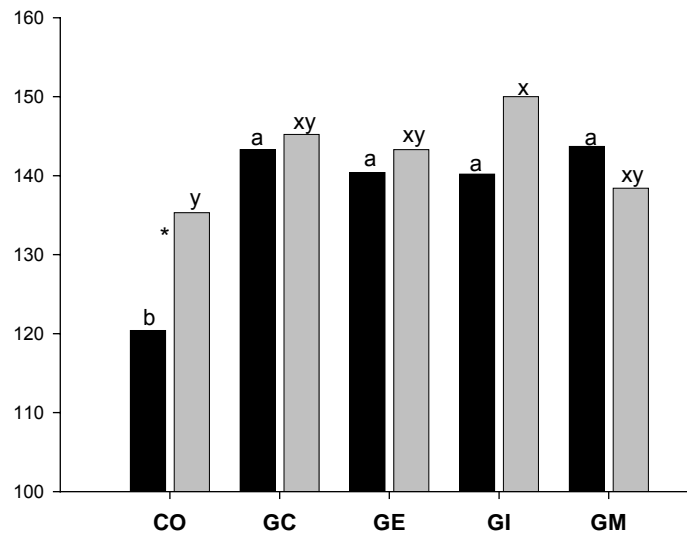


Figure 3

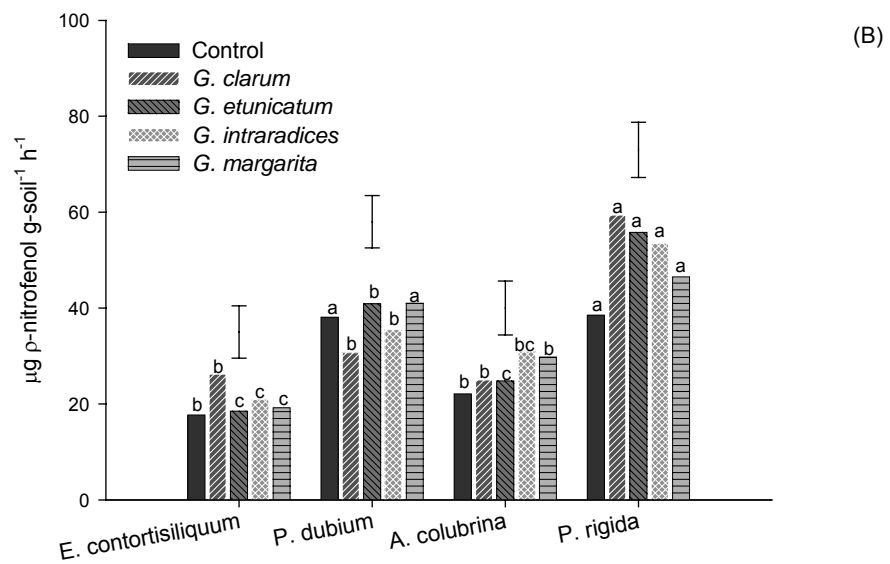
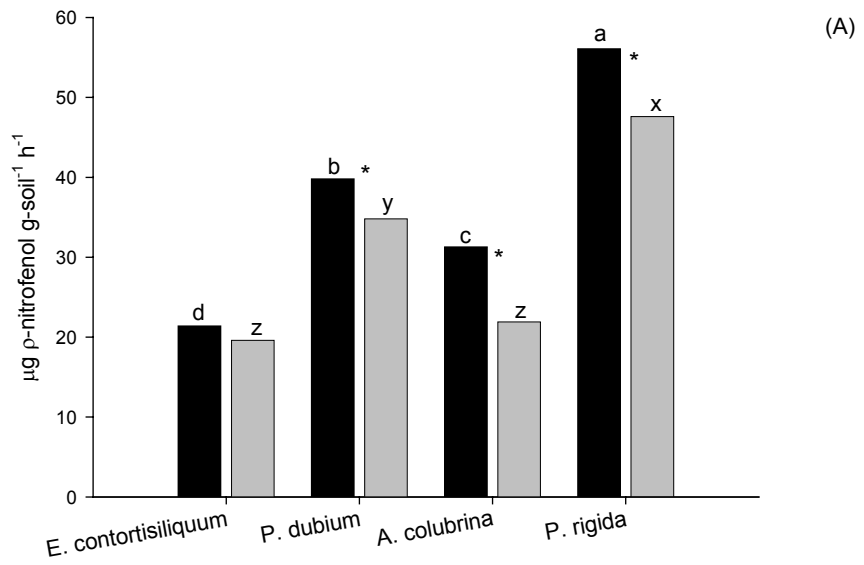


Figure 4

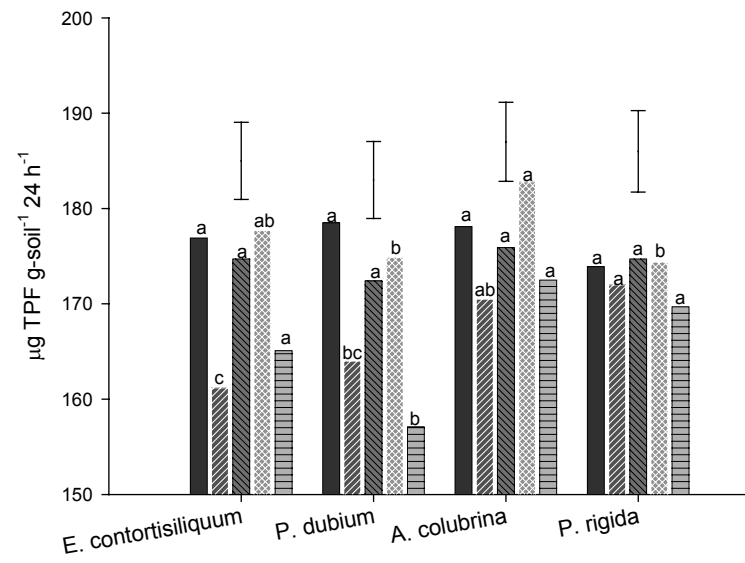


Figure 5

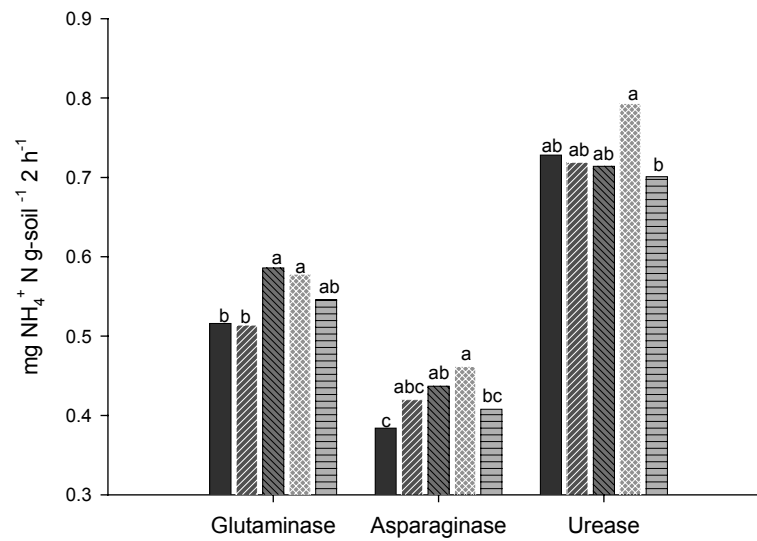


Figure 6

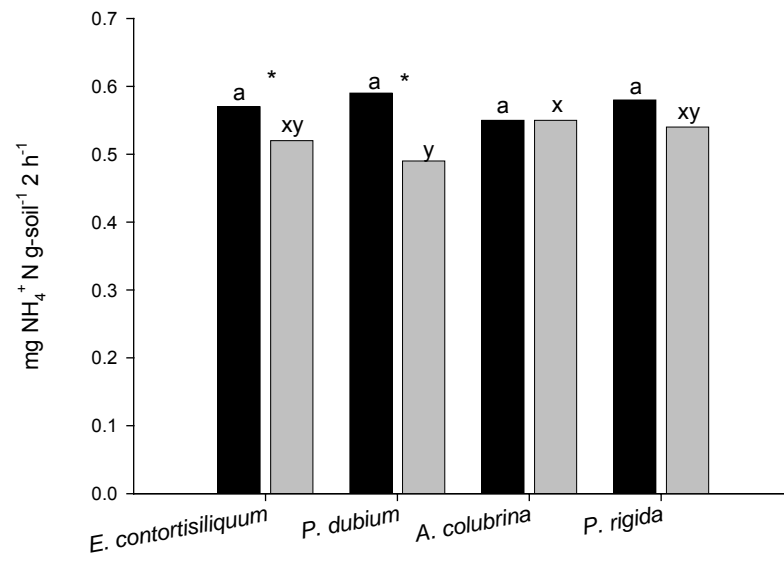


Figure 7

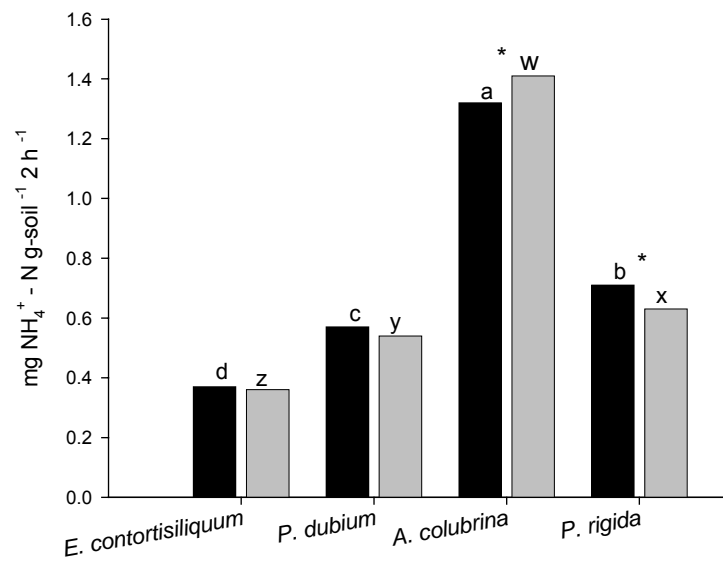


Figure 8

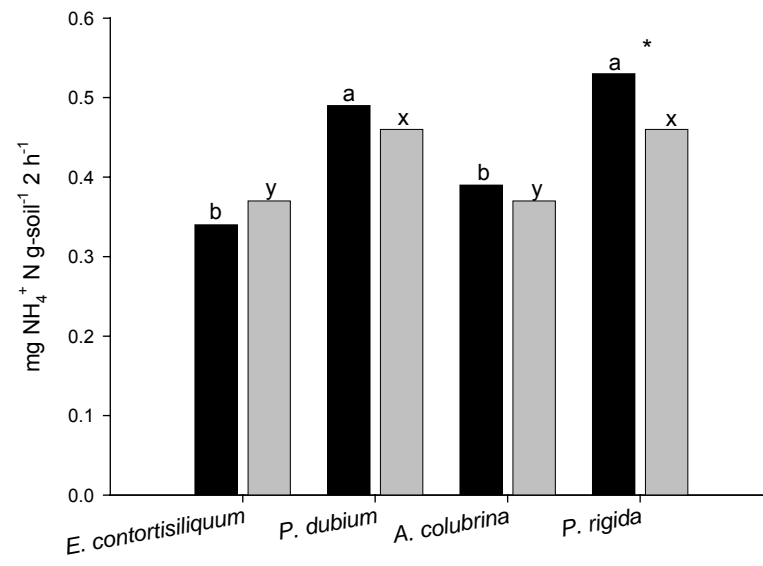


Figure 9

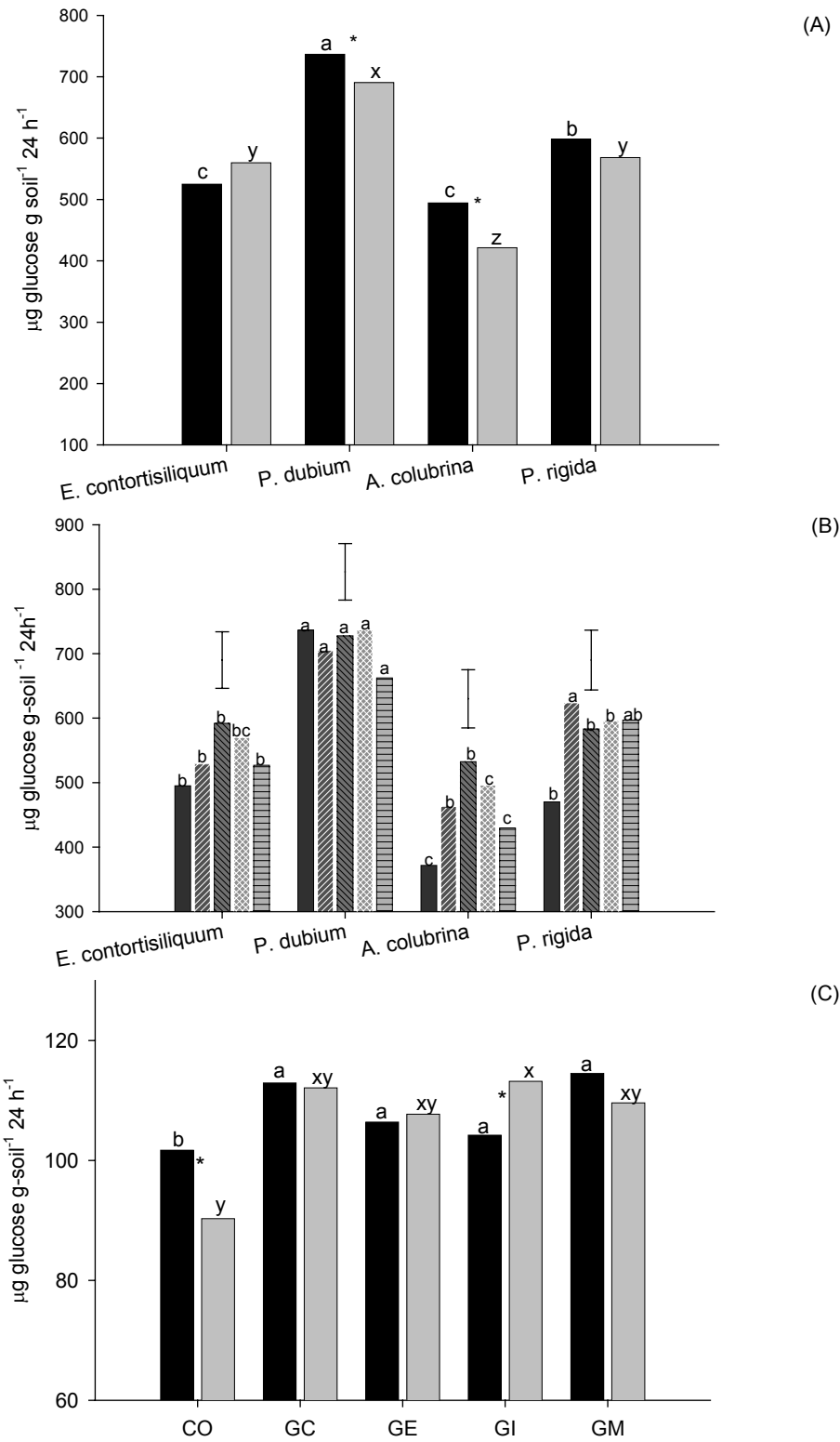


Figure 10

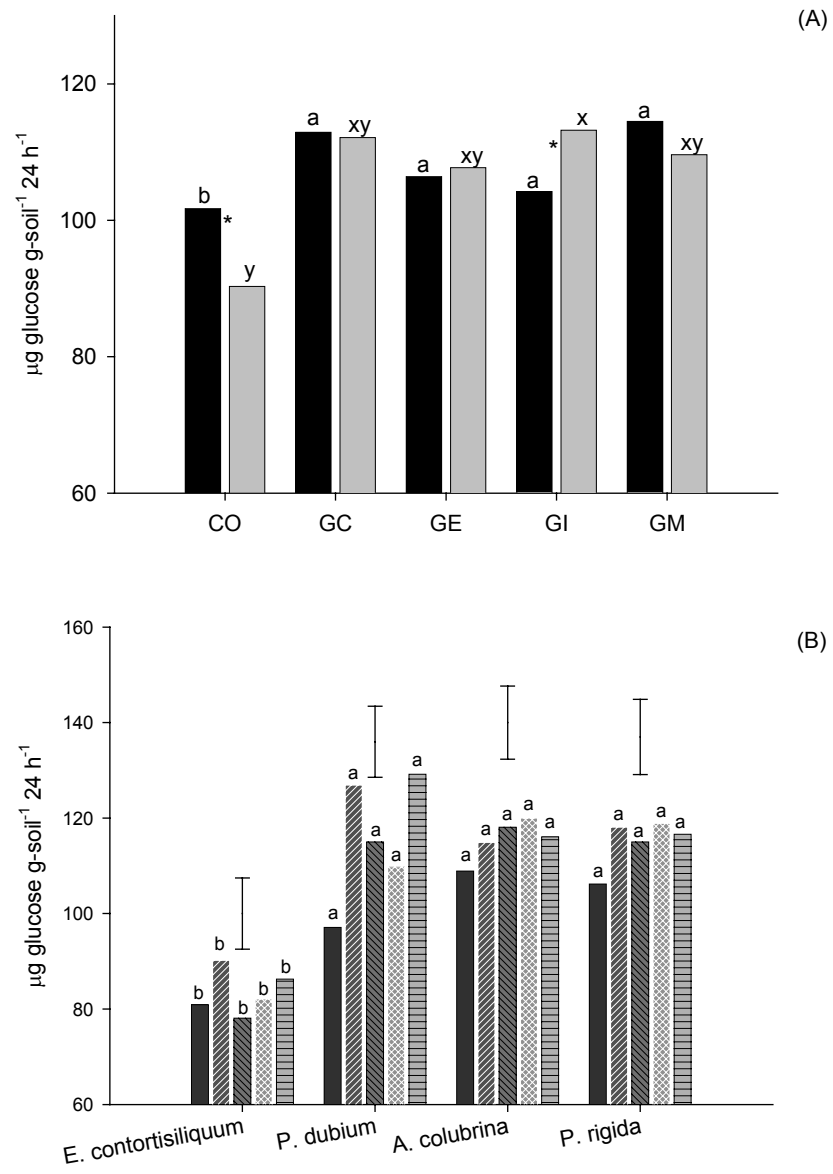


Figure 11

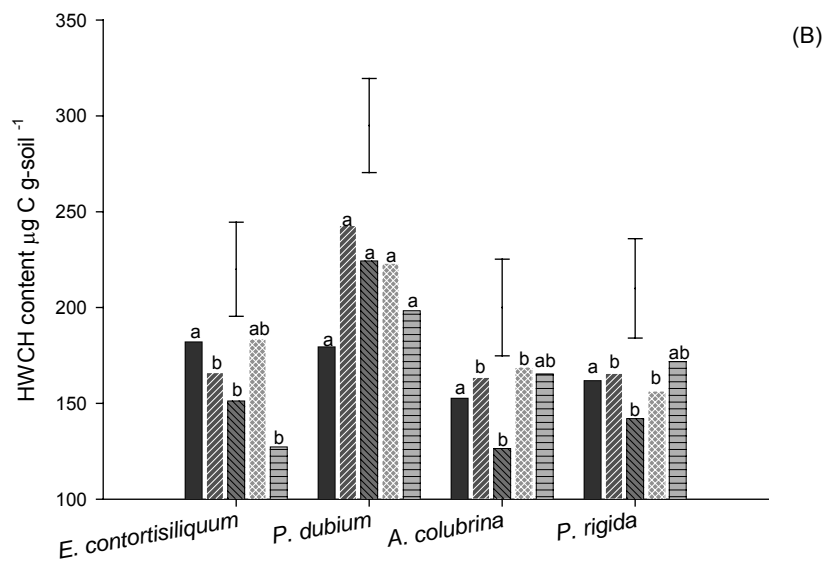
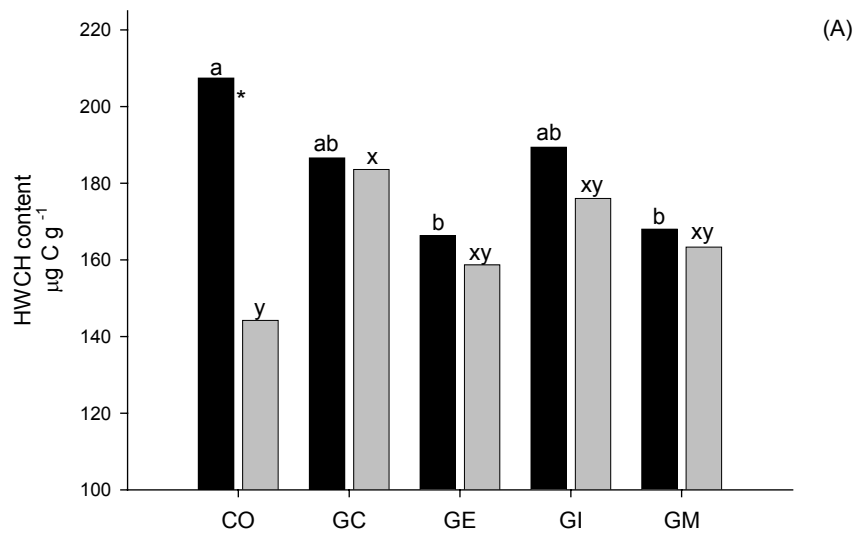


Figure 12

