



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

ISSN 0104-6187

**QUANTIFICAÇÕES DAS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS EM GERAL, DE
BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E DE ACTINOMICETOS
EM SOLOS**

Seropédica, RJ
1996



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

ISSN 0104-6187

**QUANTIFICAÇÕES DAS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS EM GERAL, DE
BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E DE ACTINOMICETOS
EM SOLOS**

João Carlos Pereira
Maria Cristina Prata Neves
Adam Drozdowicz

Seropédica, RJ
1996

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à

EMBRAPA-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021) 682-1086; (021) 682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021) 682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Tiragem: 100 exemplares

Comitê de Publicações:

Johanna Döbereiner (Pres.)
Helvécio De-Polli
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Eliane Maria da Silva Monteiro
Dejair Lopes de Almeida
Dorimar dos Santos Felix (Bibliot.)

PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 21p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 26).

1. Solo - Bactéria. 2. Antibióticos. 3. Actinomicetos. I. Neves, M.C.P., colab. II. Drozdowicz, A., colab. III. Título. IV. Série.

CDD 631.46

© EMBRAPA

QUANTIFICAÇÕES DAS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS EM GERAL, DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E DE ACTINOMICETOS EM SOLOS.¹

J. C. Pereira²

M.C.P. Neves²

A. Drozdowicz³

1 - INTRODUÇÃO

As avaliações das densidades populacionais na comunidade microbiana nos solos, são importantes, tanto na identificação de fatores que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos, como na caracterização das relações entre os diferentes grupos e espécies de microrganismos. Frequentemente estas avaliações são feitas com base em diluições seriadas da suspensão do solo, com contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas de Petri. Esta técnica também permite a distinção de microrganismos específicos como solubilizadores de fosfatos, celulíticos, resistentes a antibióticos, populações de actinomicetos oriundas de micélios e de esporos, etc...

Nas estimativas das densidades populacionais dos microrganismos do solo, a utilização de meio de cultura único é inviável, já que muitas necessidades nutricionais dos microrganismos ainda são desconhecidas, enquanto que outras são específicas, podendo variar dentro de uma população a nível de espécies ou mesmo de estirpes (Williams & Wellington 1982; Drozdowicz 1991; Wellington & Toth 1994). Assim, a escolha do meio de cultura é uma etapa crítica nas avaliações quantitativas, visto que

¹ Extraído da dissertação de Doutorado em Agronomia (Área de Solos) - UFRRJ, do primeiro autor.

² Eng. Agr., PhD., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

³ Biólogo, PhD., Prof. Adjunto do Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

somente parte das populações são contabilizadas em função da diversidade nutricionais apresentadas pelos microrganismos.

A adequação dos procedimentos na preservação e no período de armazenamento das amostras de solo, do momento da coleta até a sua utilização laboratorial, também é de importância fundamental no processo de avaliação da comunidade microbiana. As modificações das condições físicas, químicas e biológicas destas amostras devem ser minimizadas, visto que a atividade dos microrganismos é um processo dinâmico ao longo do tempo, dependendo das condições ambientais (Andrade & Hamakawa 1994).

Este trabalho teve como objetivo a adequação de técnicas e de manuseio na amostragem do solo, de modo que as estimativas das densidades das populações bacterianas nos solos, se tornem mais precisas.

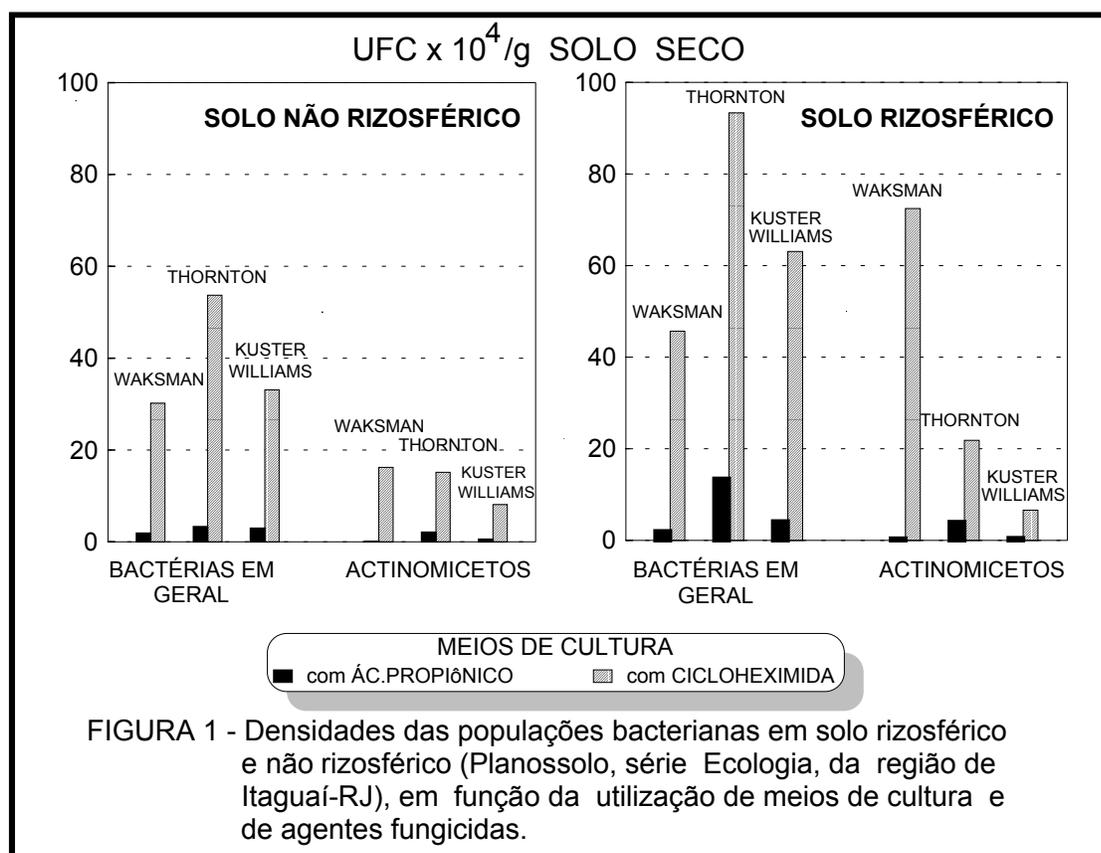
2 - SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Na seleção de meios de cultura deve-se considerar a presença de nutrientes na forma assimilável, que servem como fonte de energia e de carbono para os microrganismos, sendo que as necessidades nutricionais geralmente são específicas. Tem-se observado que, normalmente as populações fúngicas se desenvolvem melhor em meios com alta relação carbono - nitrogênio, enquanto que para as populações bacterianas o melhor desenvolvimento acontece em meios com baixa relação carbono - nitrogênio (Gray & Williams 1975).

Na comunidade bacteriana também existe variabilidade entre as populações de bactérias em geral e de actinomicetos, em relação a utilização dos nutrientes presentes no meio de cultura (Figura 1). Observa-se que as contagens das populações oriundas do solo não rizosférico e rizosférico, nos meios de cultura descrito por Thornton (1922), Waksman (1961) e Küster & Williams (1964) resultaram em números médios de UFC que variaram de 1,9 a $93,3 \times 10^4$ /g solo seco para as populações de bactérias em geral e de 0,1 a $72,4 \times 10^4$ /g solo seco para as populações de actinomicetos. Estas

populações apresentaram densidades semelhantes as encontradas por outros autores em outros solos (Nuernberg et al. 1984; Cattelan & Vidor 1990ab).

A utilização do meio de cultura Thornton permitiu o crescimento de um maior número de UFC de bactérias em geral, enquanto que para as populações de actinomicetos este efeito foi observado com a utilização do meio Waksman, principalmente no solo rizosférico. Estes resultados estão de acordo com observações feitas por Coelho (1976), onde o meio Waksman quando comparados com outros doze meios de cultura, mostrou-se como sendo de maior conveniência para as avaliações quantitativas das populações destes microrganismos.

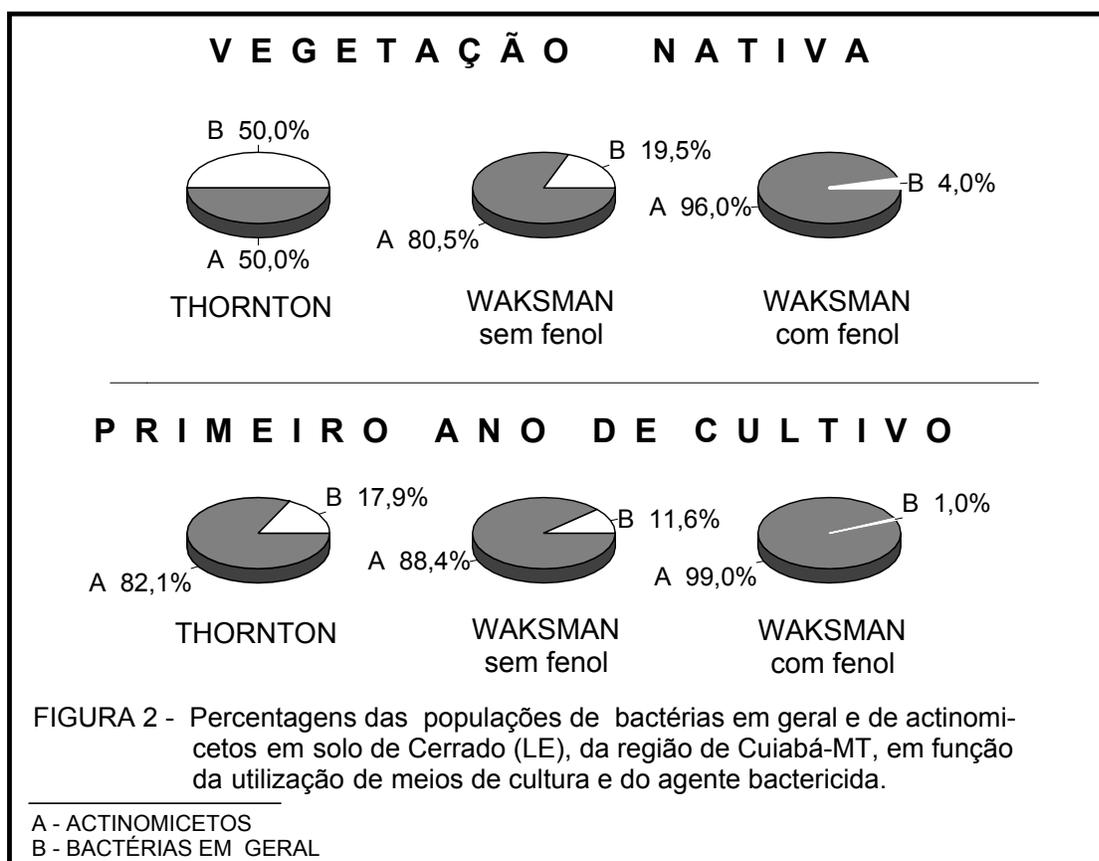


3 - UTILIZAÇÃO DE AGENTES SELETIVOS

A adição de substâncias químicas inibidoras do crescimento de determinadas populações de microrganismos nos meios de cultura pode tornar as avaliações mais específicas. Tem-se observado que a adição de agentes antibacterianos favorece o crescimento fúngico, enquanto que os antifúngicos resultam em melhor desenvolvimento das populações bacterianas. Por outro lado, a combinação adequada de inibidores bacterianos e fúngicos nos meios de cultura, pode favorecer o desenvolvimento das populações de actinomicetos.

A utilização de 300 µg cicloheximida (actidione) /ml (Panthier et al. 1979), ou de quatro gramas de ácido propiônico ($C_3H_5O_2Na$) /l (Korn-Wendisch & Kutzner 1992), nos meios Thornton, Waksman e Küster & Williams, resultou no controle eficiente das populações fúngicas. Entretanto, o uso do ácido propiônico também teve como consequência decréscimos nos números de UFC, tanto para as populações de bactérias em geral como para as de actinomicetos, sendo que no meio Waksman as reduções das UFC de actinomicetos foram acentuadas. Estes dados evidenciam que o ácido propiônico como agente seletivo não apresentou somente ação antifúngica, mas também antibacteriana indiscriminada na comunidade bacteriana.

O fenol quando adicionado na diluição inicial da amostra do solo, à razão de 631 mg de fenol /90 ml de solução salina também apresenta efeito antibacteriano (Figura 2). Observa-se que no meio Thornton as UFC de actinomicetos oriundas do solo com vegetação nativa e com primeiro ano de cultivo de soja, corresponderam respectivamente a 50 e 82,1% do número total de UFC bacteriana contabilizadas neste meio. Com a utilização do meio Waksman as UFC de actinomicetos no solo com vegetação nativa e com primeiro ano de cultivo de soja, passaram a corresponder, respectivamente, a 80,5 e 88,4% do total de UFC bacteriana. Estes dados confirmam resultado anteriormente apresentado, onde evidenciou-se a melhor adequação do meio Waksman para avaliações das densidades das populações de actinomicetos nos solos.



Observa-se também que a seletividade do meio Waksman aumentou com a utilização do fenol, diminuindo o número de UFC de bactérias em geral. Assim, as populações de actinomicetos oriundas do solo com vegetação nativa e com primeiro ano de cultivo de soja passaram a corresponder, respectivamente, a 96 e 99% das UFC de bactérias em geral enumeradas neste meio de cultura, evidenciando a especificidade do fenol como agente antibacteriano específico.

4 - MICRORGANISMOS ESPECÍFICOS

As densidades das populações de microrganismos específicos podem ser estimadas qualitativa e quantitativamente através de atributos que os microrganismos apresentam, e que possibilitam a sua diferenciação dos demais (Coelho 1976; Panthier et al. 1979; Williams & Wellington 1982; Korn-Wendisch & Kutzner 1992). A

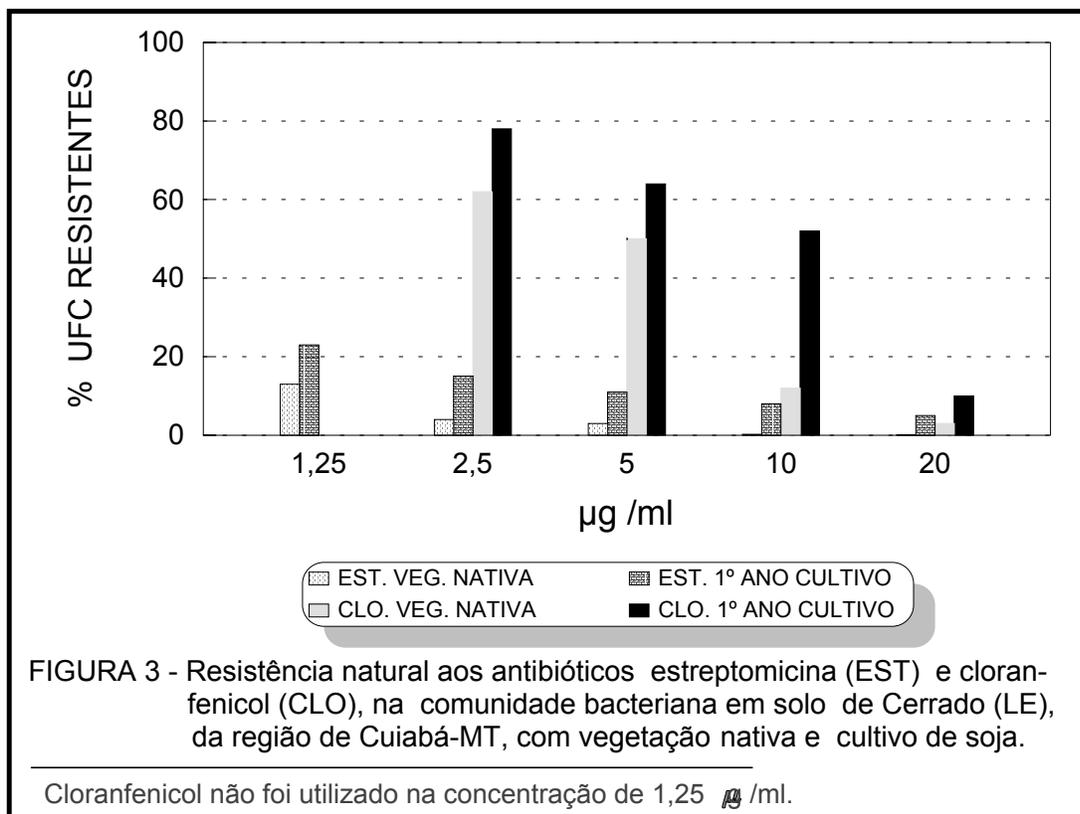
caracterização das populações que apresentam como atributo a resistência intrínseca a antibióticos tem sido usada como técnica viável em estudos ecológicos da comunidade bacteriana nos solos (Pereira 1983; Pereira et al. 1994). Entretanto, deve-se considerar que a resistência intrínseca das populações aos antibióticos, é determinada por uma série de fatores relacionados com as condições ambientais, sendo que os níveis de resistência são acentuadamente influenciados pelo tipo de solo, assim como pelo seu uso e manejo.

Em solo de Cerrado tem-se observado que as freqüências médias de resistências natural aos antibióticos estreptomicina e cloranfenicol apresentadas pelas populações bacterianas, são variáveis (Figura 3). Para a estreptomicina, o valor mínimo de 0,2% foi obtido na concentração de 20 µg /ml, em solo com vegetação nativa, e o máximo de 21,9% na concentração de 1,25 µg /ml, em solo cultivado. Enquanto que, as freqüências de resistência ao cloranfenicol foram mais elevadas, variando de 2,5% na concentração de 20 µg /ml, em solo com vegetação nativa a 78,1% em 2,5 µg /ml, em solo cultivado.

A diversidade de comportamento apresentada pelas populações bacterianas, em relação a resistência natural as diversas concentrações de estreptomicina e cloranfenicol, pode estar relacionada com o antagonismo exercido pela comunidade microbiana nos solos. Nesta, as populações de actinomicetos são provavelmente as mais importantes, visto que em solos de Cerrados a freqüência destes microrganismos na comunidade microbiana é superior a 77% (Coelho & Drozdowicz 1978). Da mesma forma, deve-se considerar que este comportamento pode estar associado com a inativação dos antibióticos produzidos, devido a adsorção pelas argilas minerais (Pramer & Starkey 1972) ou à sua instabilidade estrutural nas condições do solo (Drozdowicz 1969), além da degradação biológica (Pramer 1953).

Além disso, estes dados podem estar relacionados com a utilização pela célula bacteriana, de mecanismos genéticos de resistência a estes antibióticos, e que normalmente ocorrem através de diferentes mecanismos bioquímicos de ação, tais como: modificação e inativação enzimática do antibiótico; diminuição da permeabilidade

bacteriana ao antibiótico; e modificação ou ausência do receptor ao antibiótico (Tavares 1982; Araújo 1994).



5 - MANUSEIO DAS AMOSTRAS DE SOLO

A adequação do manuseio das amostras de solo é fundamental nas avaliações qualitativas e quantitativas das populações microbianas dos solos, visto que uma amostra manuseada inadequadamente não revela, em seu aspecto, se mantém ou não as características biológicas do momento da amostragem (Andrade & Hamakawa 1994).

As condições de preservação e o período de armazenamento das amostras de solo influenciam as atividades e as densidades das populações microbianas, sendo que cada grupo de microrganismo é afetado de maneira diferenciada. A importância do manuseio das amostras pode ser minimizada ou maximizada por fatores ambientais

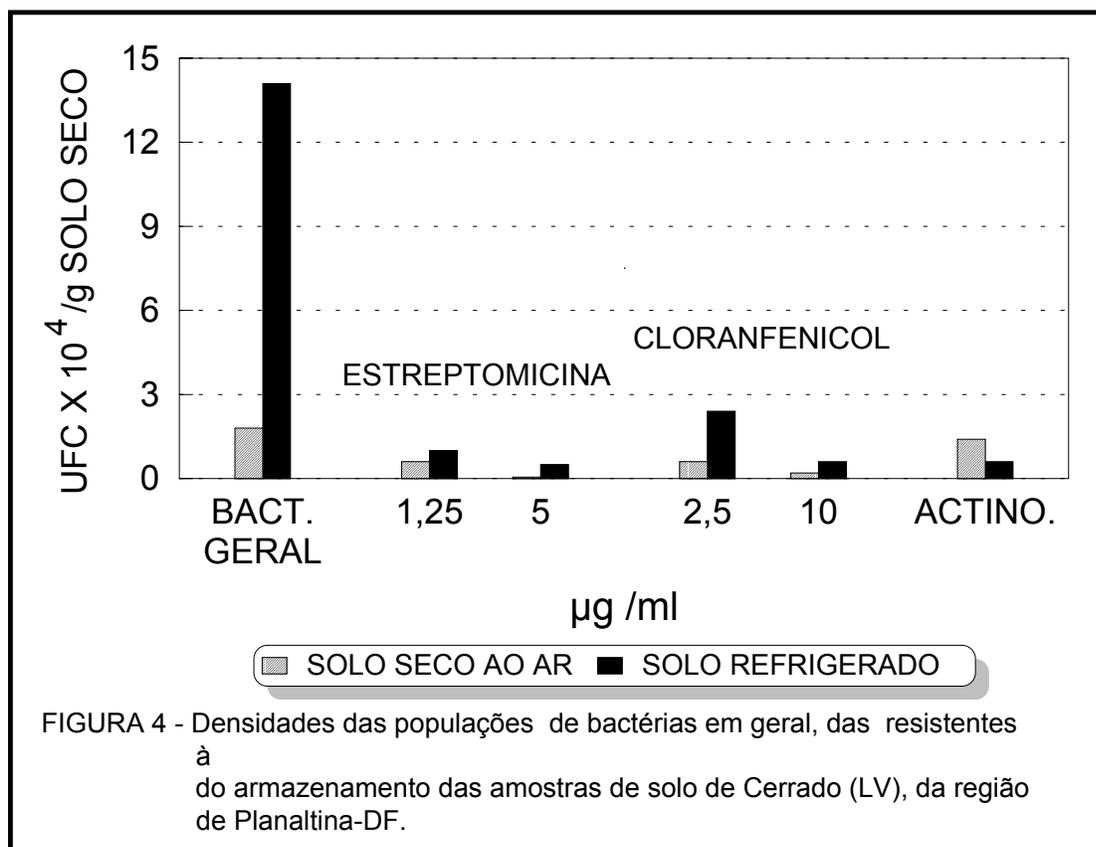
abióticos, como por exemplo a temperatura do solo, determinante dos processos bioquímicos e da taxa de crescimento dos microrganismos. Segundo Parkinson et al. (1971), o prolongamento do tempo entre a coleta e a avaliação microbiológica pode ser feito através de refrigeração das amostras, argumentando-se que a multiplicação das células microbianas poderá ser inibida em temperaturas baixas. Porém, pouco se conhece sobre o efeito desta prática na taxa de mortalidade dos microrganismos no solo e na estabilidade da comunidade restante.

Em solo de Cerrado da região de Planaltina tem-se observado que as densidades das populações microbianas em amostras refrigeradas e secas ao ar são diferenciadas (Figura 4). Na amostra refrigerada, as densidades das populações de bactérias em geral e das resistentes aos antibióticos estreptomicina e cloranfenicol foram maiores do que na amostra seca ao ar, enquanto que as densidades das populações de actinomicetos foram menores. Verificou-se que na amostra de solo refrigerada 7,1 e 3,5% das populações bacterianas apresentaram, respectivamente, resistência natural a 1,25 e 5,0 μg de estreptomicina /ml. Por outro lado, 17,0 e 4,2% foram resistentes a 2,5 e 10,0 μg de cloranfenicol /ml, respectivamente. Enquanto que, na amostra de solo seca ao ar, 33,3 e 2,8% das populações bacterianas foram resistentes a 1,25 e 5,0 μg de estreptomicina /ml, e 33,3 e 11,1% a 2,5 e 10,0 μg de cloranfenicol /ml.

Observou-se também que o decréscimo médio observado para o número de UFC/g solo seco de bactérias em geral na amostra seca ao ar em relação a amostra refrigerada foi de 87,2 p.p. (pontos percentuais). Para as populações com resistência natural a 1,25 e 5,0 μg de estreptomicina /ml as reduções respectivas foram de 40 e 90,0 p.p. Enquanto que, para as populações resistentes a 2,5 e 10,0 μg de cloranfenicol /ml foram de 75,0 e 66,7 p.p. Por outro lado, o número de UFC /g solo seco de actinomicetos nesta amostra foram 133,3 p.p. maiores do que as observadas na amostra de solo refrigerada.

Tem-se verificado que os gêneros e as espécies dos microrganismos no solo são determinados pelas forças que atuam no ecossistema (Cattelan & Vidor 1990b; Kirchner et al. 1993). Fatores ambientais como a umidade e a temperatura no solo podem

influenciar o equilíbrio na comunidade bacteriana neste solo. Entretanto, a importância destes fatores como determinantes das densidades das populações bacterianas no solo é difícil de ser definida, visto que estes geralmente estão associados e seus efeitos são difíceis de serem avaliados isoladamente (Wardle & Parkinson 1990). Assim, as diferenças no comportamento destas populações podem estar relacionadas com o estresse em que a amostra de solo foi submetida.



As densidades das populações das bactérias em geral, das resistentes à 1,25 e 5,0 µg de estreptomicina /ml e 2,5 e 10 µg de cloranfenicol /ml e de actinomicetos em solo de Cerrado da região de Sete Lagoas, foram avaliadas em função do meio de cultura e do tempo de armazenamento das amostras de solo em condições refrigeradas (Figura 5). De modo geral, observa-se que nos meios Pramer & Schmidt (1964) e

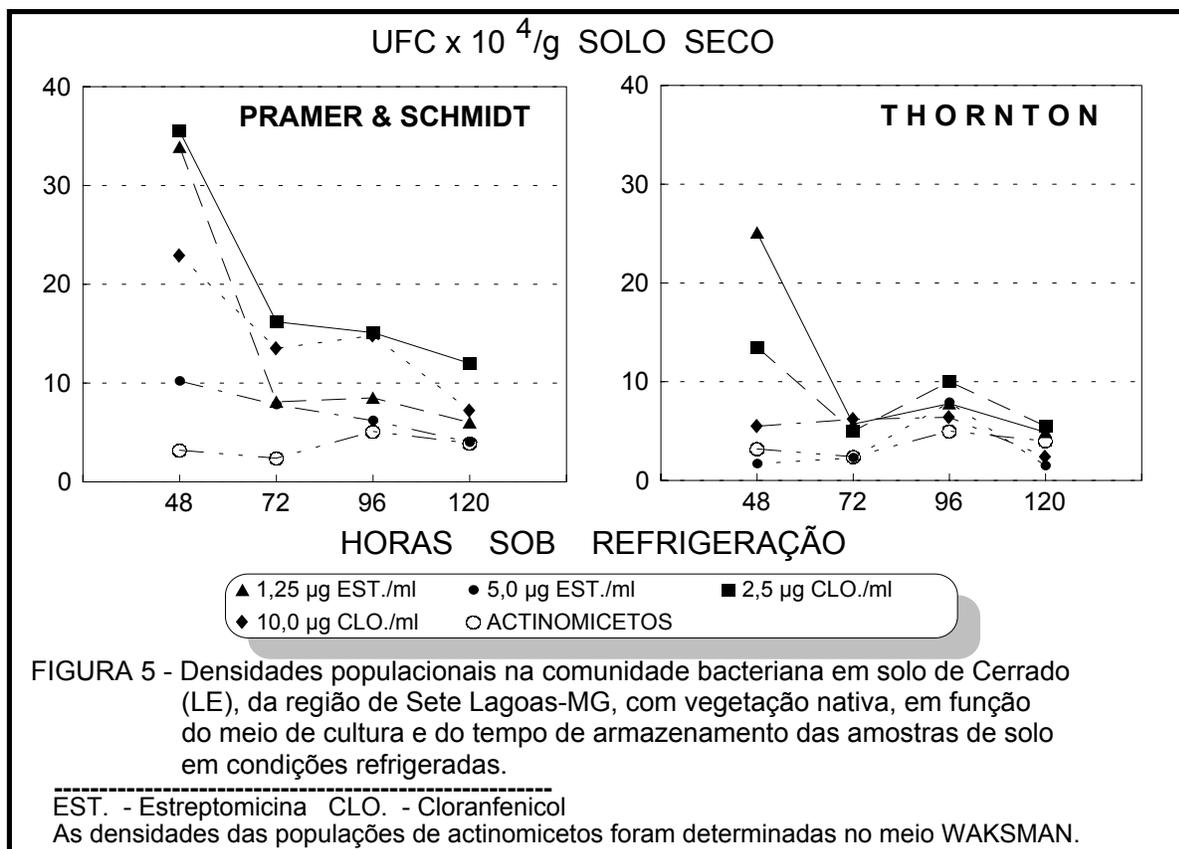
Thornton as densidades das diversas populações na comunidade bacteriana foram variáveis durante as 120 horas sob refrigeração.

Nestas condições, as densidades populacionais de bactérias em geral foram dez vezes superiores ao das demais populações bacterianas, sendo que no meio Pramer & Schmidt o número de UFC variaram, respectivamente, de 195,0 a $39,8 \times 10^4$ /g solo seco, nas amostras sob 48 e 120 horas sob refrigeração. Enquanto que, no meio Thornton a variação foi de 38,9 a $154,9 \times 10^4$ UFC /g solo seco, respectivamente (dados não apresentados). Por outro lado, no meio Waksman os números de UFC de actinomicetos permaneceram relativamente estáveis durante o período de armazenamento, variando de 2,4 a $5,1 \times 10^4$ /g solo seco, evidenciando que estas populações não foram influenciadas pelo período de refrigeração da amostra de solo.

A utilização do meio de cultura Pramer & Schmidt resultou em incrementos médios dos números de UFC das bactérias com resistência intrínseca a estreptomicina, variando de 9,0% na concentração de 1,25 μg /ml em 96 horas sob refrigeração a 500% em 5,0 μg deste antibiótico /ml em 48 horas refrigeradas. Para as populações resistentes ao cloranfenicol, os incrementos nos números de UFC /g solo seco variaram respectivamente de 51,6 a 316,4% nas concentrações de 2,5 e 10,0 μg /ml, nas amostras sob refrigeração de 96 e 48 horas. Os percentuais das populações das bactérias resistentes a estes antibióticos também foram variáveis e mais elevados quando utilizou-se este meio de cultura.

Os aumentos médios dos números de UFC de bactérias com resistência intrínseca a estreptomicina e ao cloranfenicol, assim como os percentuais mais elevados de resistência das populações bacterianas obtidos a partir do meio de Pramer & Schmidt

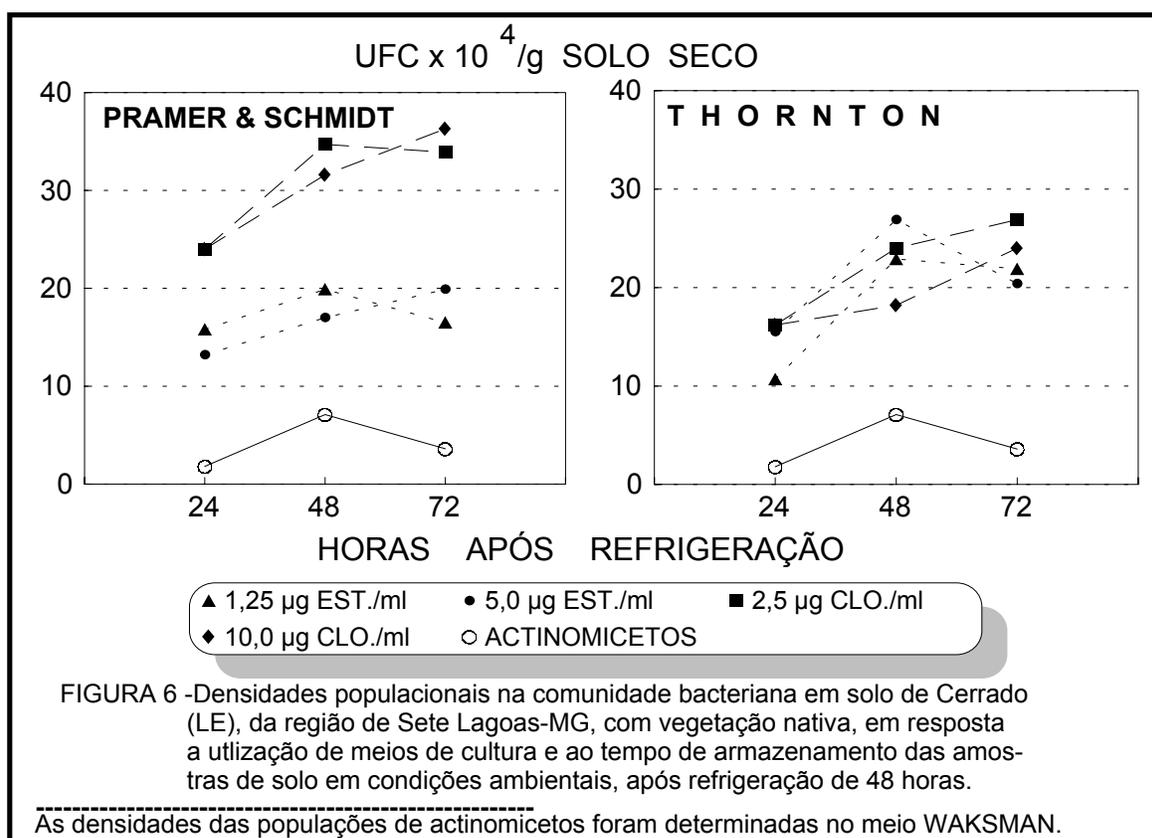
podem estar relacionados com a pouca diversidade morfológica apresentadas pelas colônias crescendo neste meio (normalmente translúcidas e gomosas).



As densidades das populações de bactérias em geral, das resistentes à 1,25 e 5,0 µg de estreptomicina /ml e 2,5 e 10 µg de cloranfenicol /ml e de actinomicetos apresentaram variações na amostra de solo sem refrigeração, após ser submetida a refrigeração inicial de 48 horas (Figura 6). Nestas condições, as densidades médias das populações de bactérias em geral nos meios Pramer & Schmidt e Thornton permaneceram relativamente estáveis durante o período de condução experimental, variando de 128,8 a 234,4 × 10⁴ UFC /g solo seco (dados não apresentados).

As dinâmicas das populações resistentes a estreptomicina e cloranfenicol nestes meios foram diferenciadas. No meio Pramer & Schmidt os números de UFC das bactérias resistentes aos níveis mais elevados destes antibióticos aumentaram durante o período de condução experimental, enquanto que no meio Thornton este

comportamento foi observado para as populações de bactérias resistentes a 2,5 e 10,0 μg de cloranfenicol /ml. Conseqüentemente, os percentuais mais elevados de UFC das populações bacterianas com resistência natural a estas concentrações foram observados em 72 horas após refrigeração. Verificou-se ainda que no meio Waksman, houve um incremento médio de 297,8% no número de UFC de actinomicetos 48 horas após refrigeração inicial (dados não apresentados).



As densidades diferenciadas apresentadas pelas populações bacterianas em relação ao tempo decorrido entre a coleta da amostra e a sua utilização laboratorial, podem estar associados com o estresse provocado pelas mudanças nas temperaturas do solo, determinando modificações qualitativas e quantitativas na comunidade bacteriana. Desta forma, populações bacterianas que apresentam crescimento e atividade otimizados na temperatura ambiente em que as amostras foram utilizadas estariam

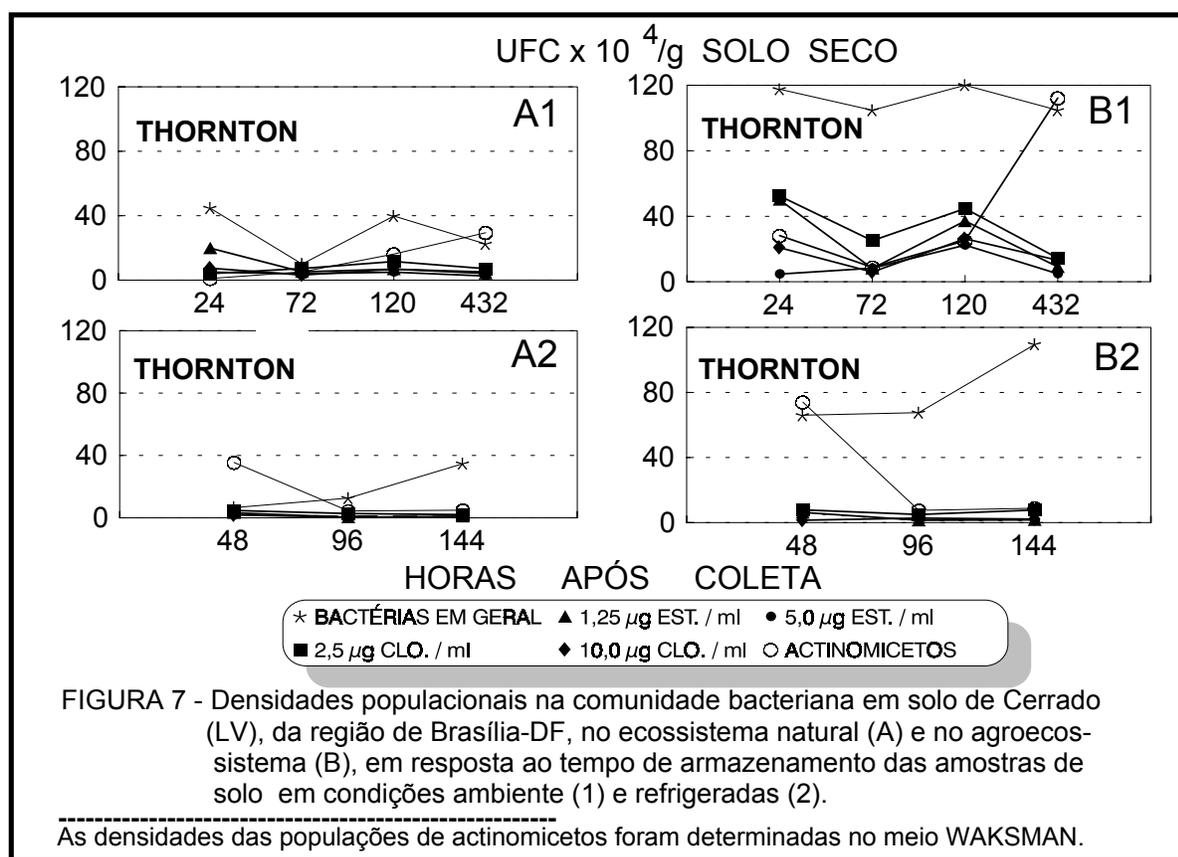
sendo beneficiadas. Tem-se observado que temperaturas fora da faixa ótima, provocam depressão tanto nas populações microbianas como nas suas funções, em valores superiores a 50%, podendo atingir 99% (Cattelan & Vidor 1990a). Estas variações também podem ser conseqüência da refrigeração inicial em que as amostras do solo foram submetidas, determinando, em parte, o ritmo metabólico e o crescimento das populações bacterianas.

As densidades das populações de bactérias em geral, das resistentes à 1,25 e 5,0 μg de estreptomicina /ml e 2,5 e 10 μg de cloranfenicol /ml e de actinomicetos foram avaliadas em solo de Cerrado da região de Planaltina com vegetação nativa e com cultivo de soja em função do tempo de armazenamento das amostras de solo em condições sem refrigeração e refrigeradas (Figura 7). Observa-se que as densidades das populações bacterianas em resposta às condições especificadas foram variáveis. Nas amostras de solo sem refrigeração, os números de UFC /g solo seco das populações de bactérias com resistência natural aos antibióticos estreptomicina e cloranfenicol foram maiores do que ao das amostras sob refrigeração.

Verifica-se também que o comportamento das populações de actinomicetos foi variável. Nas amostras sem refrigeração com solo sob vegetação nativa, as densidades das populações destes microrganismos variaram de 1 a $29,5 \times 10^4$ UFC /g solo seco. Enquanto que, no solo cultivado a variação foi de 8,9 a $112,2 \times 10^4$ UFC /g solo seco. Em contra partida, nas amostras refrigeradas, houve um declínio nas densidades populacionais em 96 horas, estabilizando-se em 144 horas nestas condições.

Os efeitos observados podem estar associados a vários fatores, como a temperatura, cujas influências sobre a comunidade bacteriana foi descrito anteriormente. A modificação na aeração das amostras provocado pela coleta do solo é outro fator que deve ser considerado, visto que tem-se observado que a aeração promove modificações nas condições físico-químicas e nutricionais do solo, influenciando qualitativa e quantitativamente a comunidade microbiana. Porém, seus efeitos são complexos, de difícil avaliação e, geralmente, de durabilidade variável, visto que dependem também do sistema de cultura (Nuernberg et al. 1984; Cattelan & Vidor 1990a), das variações ambientais e da fertilidade e do teor de matéria orgânica do solo

(Cattelan & Vidor 1990b; Wardle & Parkinson 1990). Estes resultados evidenciam que a temperatura do solo é um fator que pode ser determinante da densidade da comunidade bacteriana nos solos, especialmente na abundância das populações de actinomicetos, o que confirma observações anteriores (Alexander 1980). Deve-se também ressaltar que a abundância destes microrganismos pode influenciar as densidades das demais populações bacterianas, através do antagonismo exercido com a produção de antibióticos (Baldani et al. 1982).



6 - CONCLUSÕES

1 - Os meios de cultura descritos por Thornton e Waksman mostraram-se respectivamente mais adequados para as avaliações das densidades das populações de bactérias e de actinomicetos.

2 - A adição do ácido propiônico ao meio de cultura, além da ação antifúngica, resultou em efeito bactericida indiscriminado sobre a comunidade bacteriana. Enquanto que a adição do fenol na diluição inicial do solo teve como consequência o aumento da seletividade do meio de cultura, eliminando parte das populações bacterianas sem influenciar as populações de actinomicetos.

3 - As estimativas das populações bacterianas foram afetadas pelo armazenamento e pela refrigeração das amostras; as contagens foram mais elevadas nas amostras de solo armazenadas sem refrigeração

7 - AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da EMBRAPA do CNPAB, CPAC e CNPGL, pelo apoio técnico fornecido.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. México, D.F.: Libros y Editoriales, 1980. 491p.

ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., ed. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-92. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 46).

ARAÚJO, R.S. Geração e análise de mutantes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., ed. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.227-236. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 46).

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.13, n.3, p.250-263, 1982.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.125-132, 1990a.

- CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.133-142, 1990b.
- COELHO, R.R.R. **Ocorrência de actinomicetos em solos de Cerrado, capazes de utilizar compostos aromáticos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976. 111p. Tese Mestrado.
- COELHO, R.R.R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. **Révue D Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v.15, n.4, p.459-473, 1978.
- DROZDOWICZ, A. O papel ecológico dos microrganismos do solo produtores de antibióticos. **Anais de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v.16, p.71-95, 1969.
- DROZDOWICZ, A.G. Microbiologia Ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, I.R.; AZEVEDO, J.L., eds. **Tratado de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Manole, 1991. v.2. p.1-102.
- GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. **Soil Micro-organisms**. 2.ed. London: Longman, 1975. 240p.
- KIRCHNER, M.J.; WOLLUM, A.G.II; KING, L.D. Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 57, p.1289-1295, 1993.
- KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H.J. The family streptomycetaceae. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K-H., ed. **The Prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.921-995.
- KÜSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, London, v.202, p.928-929, 1964.
- NUERNBERG, N.J.; VIDOR, C.; STAMMEL, J.C. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.8, p.197-203, 1984.
- PANTHIER, J.J.; DIEM, H.G.; DOMMARGUES, Y. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.11, p.443-445, 1979.
- PARKINSON, D.; GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. **Methods for studying the ecology of soil micro-organisms**. London: International Biological Programme, 1971. 116p. (IBF Handbook, n.19).

- PEREIRA, J.C. **Obtenção e avaliação de mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983. 88p. Tese Mestrado.
- PEREIRA, J.C.; GAVA, C.A.T.; NEVES, M.C.P. Avaliação da resistência natural de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* à antibióticos e ao antagonismo promovido por actinomicetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* E *BRADYRHIZOBIUM*, 6, Londrina, 1994. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1994, p.120.
- PRAMER, D. Observations on the uptake and translocation of five actinomycetes antibiotics by Cucumber seedlings. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.40, p.617-622, 1953.
- PRAMER, D.; SCHIMDT, E.L. Bacteria and actinomycetes by the dilution plate method. In: _____ . **Experimental soil microbiology**. Minneapolis: Burgess, 1964. p.35-37.
- PRAMER, D.; STARKEY, R.L. Decomposition of streptomycin in soil and by an isolate bacterium. **Soil Science**, Baltimore, v.114, p.451-455, 1972.
- TAVARES, M. **Manual de antibióticos para estudantes de medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1982. 374p.
- THORNTON, H. G. On the development of a standardized agar medium for counting soil bacteria with special regard to the repression of spreading colonies. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v 9, p.241-274, 1922. WAKSMAN, S.A. **The actinomycetes**; classification, identification and descriptions of genera and species. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1961.
- WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.9, n.3, p.273-280, 1990.
- WELLINGTON, E.M.H.; TOTH, I.K. Actinomycetes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S., ed. **Methods of soil analysis**. 3.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.269-290.
- WILLIAMS, S.T.; WELLINGTON, E.M.H. *Actinomycetes*. In: PEGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., ed. **Methods of soil analysis**. 2.ed. Madison: ASA/SSSA, 1982. p.964-987. (Agronomy, n.9).