

# SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS ASSIMBIÓTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA RIZOSFERA DO SORGO (*Sorghum vulgare* Pers.)<sup>1</sup>

ADILSON MARTINS CARNEIRO<sup>2</sup> e JOHANNA DÖBEREINER<sup>3</sup>

## Sinopse

Para se conhecer a influência do sorgo, da calagem e da adubação nitrogenada sobre as populações de *Azotobacter* e *Beijerinckia* no solo, conduziu-se este ensaio, em casa de vegetação.

Os oito tratamentos resultaram das combinações dos tratamentos básicos: com ou sem calcário, com ou sem nitrogênio e com ou sem planta. Todos os vasos receberam a mesma adubação de fósforo, potássio e elementos menores, bem como inoculação com diversas espécies de *Azotobacter* e *Beijerinckia*.

A avaliação da influência dos tratamentos foi feita por contagem das microcolônias de bactérias em placas sílica-gel, em épocas consecutivas.

A calagem exerceu sempre efeito favorável sobre *Azotobacter*, que tendeu a desaparecer totalmente em solo ácido (pH < 5,0). A planta não parece ter causado grande influência no desenvolvimento de *Azotobacter* a não ser na presença do N e da calagem. A adubação nitrogenada prejudicou tanto *Azotobacter* quanto *Beijerinckia*. Nas condições do experimento, com pH oscilando na faixa de 4,5 a 6,5 conforme tratamento, a calagem pouco favoreceu *Beijerinckia*. Houve influência pronunciada da planta (*Sorghum vulgare*, var. Sta. Eliza) sobre *Beijerinckia* confirmando trabalhos experimentais realizados com outras gramíneas.

A adubação nitrogenada abaixou o pH do solo nos vasos tratados com calcário.

## INTRODUÇÃO

No estudo dos processos biológicos da fixação de nitrogênio molecular vem despertando interesse a fixação por meio de bactérias assimbióticas.

Em diversos países esses estudos vêm sendo realizados há mais tempo, mas no Brasil, segundo Döbereiner (1959), tiveram início com Galli (1955, 1956) começando por um levantamento da ocorrência de bactérias assimbióticas fixadoras de nitrogênio. Seguiram-se estudos de Döbereiner e Castro (1955), Döbereiner (1959), Ruschel (1959), Bezerra (1963) e Batista (1965) constatando a presença de *Beijerinckia* na maior parte das amostras de solos de diversas partes do País e de *Azotobacter*, menos comum.

Quanto à influência da vegetação sobre ocorrência de bactérias assimbióticas no solo, Döbereiner e Alvahydo (1959) estudaram o efeito da cana de açúcar e notaram aumento da população de *Beijerinckia*, principalmente em solos cultivados por mais de um

ano. Prosseguindo, Ruschel e Döbereiner (1961) fizeram experiência de vasos com arroz e concluíram por um desenvolvimento melhor de *Beijerinckia* na rizosfera de arroz que no solo testemunha, com ou sem inundação.

Na mesma época, compararam os efeitos das rizosferas de arroz, milho e feijão sobre o equilíbrio microbiano. Verificou-se que ocorria um efeito favorável da rizosfera do arroz sobre *Beijerinckia*, enquanto a do feijão produzia efeito contrário, ficando a rizosfera do milho numa posição intermediária. Por outro lado, nenhum *Azotobacter* foi encontrado na rizosfera do arroz, o que foi atribuído à acidez provocada por carboidratos excretados pelas raízes.

As gramíneas forrageiras *Hiparrhenia rufa*, *Panicum maximum* e *Paspalum rotatum* influíram benéficamente sobre *Beijerinckia* (Ruschel & Britto 1966), com melhor efeito do *Paspalum notatum*.

Ruschel e Döbereiner (1965), em observações de campo, constataram o mesmo efeito para *Digitaria decumbens*, *Panicum purpureascens*, *Cynodon dactylon*, *Paspalum notatum*, *Setaria sphacelata* e *Cynodon plectostachyus*, enquanto o *Melinis minutiflora* pareceu inibir o desenvolvimento das bactérias.

Mediante inoculação de sementes de milho, tomate e trigo com culturas de *Azotobacter*, Rovira (1963) verificou que, quando as sementes foram plantadas

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 26 de junho de 1967. Boletim Técnico n.º 52 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

<sup>2</sup> Eng.º Agrônomo da Seção de Agrostologia do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26.

<sup>3</sup> Eng.º Agrônomo da Seção de Solos do IPEACS e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

em areia deficiente em elementos nutritivos, apenas o trigo mostrou resposta significativa à inoculação; quando a sementeira foi feita em terra mais fértil, além do trigo o milho respondeu à inoculação. Em culturas puras verificou-se que não houve estabelecimento satisfatório de *Azotobacter* na rizosfera destas plantas.

Procurou-se também conhecer o mecanismo pelo qual as plantas atuam na população microbiana do solo. Assim é que Vancura e Macura (1961) estudando os efeitos das excreções de raízes de trigo e cevada sobre *Azotobacter* verificaram que elas eram utilizadas como fontes de carbono e energia, com a maior ou menor habilidade de aproveitamento ficando na dependência das condições das culturas e das estirpes bacterianas.

O presente trabalho foi elaborado com o propósito de verificar o comportamento de espécies de *Azotobacter* e *Beijerinckia* em presença de raízes de sorgo que, por ser planta forrageira de interesse para o Brasil, foi escolhida.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação onde foram colocados vasos plásticos com 2,5 kg de solo. Este, pertencente à Série Itaguaí, foi colhido em condições naturais de cultivo, na área do km 47. Todos os vasos foram adubados com P, K (100 ppm de  $P_2O_5$  e 40 ppm de  $K_2O$  no solo) e elementos menores (Mg, Cu, Zn, B, Mo, Fe) e inoculados com culturas líquidas de espécies de *Azotobacter* e *Beijerinckia* (*A. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. macrocytogenes*, *A. paspali*, *B. indica* e *B. fluminensis*).

O esquema experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições e oito tratamentos, a saber:

	Calcedrio	Nitrogênio	Planta
A.....	O	O	O
B.....	+	O	O
C.....	O	+	O
D.....	+	+	O
E.....	O	O	+
F.....	+	O	+
G.....	O	+	+
H.....	+	+	+

(O — ausência + — presença)

Cada bloco continha oito vasos, cada vaso constituía uma parcela.

Para a adubação nitrogenada foi utilizada uma solução de nitrato de amônio dando uma dosagem de 100 ppm de N no solo; para os tratamentos com calcário, este foi usado em quantidade suficiente

para elevar o pH até 6,0 o que foi determinado por curva de titulação. Colocou-se 1,062 g de  $CaCO_3$  puro/vaso.

Nos vasos com planta foram semeadas 20 sementes de sorgo em cada. Os vasos foram mantidos em boas condições de umidade.

Depois que as plantinhas estavam com uma semana de idade foram retiradas amostras de todos os tratamentos, de um único bloco. Dias depois, novas amostras foram retiradas no bloco seguinte e assim por diante. As amostras, constituídas de quatro plantinhas, ou de solo apenas nos vasos sem planta, eram encaminhadas ao laboratório onde depois de secas (ao ar) se fazia determinação de pH para cada tratamento. Fêz-se inoculação de duas placas de sílica-gel impregnadas com solução de Winogradsky, uma para contagem de *Azotobacter* (placa com citrato de cálcio) e outra para contagem de *Beijerinckia* (placa com glucose).

Nos tratamentos com plantas inoculavam-se quatro placas porque a amostra era subdividida em subamostras de "rizosfera" e do "rizoplan".

A inoculação foi feita distribuindo-se 0,1 g da terra seca e tamisada a 1 mm em cada placa. A amostra da "rizosfera" era constituída por terra que se solta facilmente das raízes e "rizoplan" por terra aderente às raízes.

Feita a inoculação, as placas foram levadas para a estufa e incubadas a 30° C. A contagem de microcolônias de *Azotobacter* foi feita do 2.º ao 6.º dia; a de *Beijerinckia* do 10.º ao 20.º dia.

Os dados referem-se ao número de microcolônias por 1 grama de solo.

A primeira colheita de amostras, para inoculação de placas, foi feita treze dias após a instalação do experimento. A segunda com 21 dias e assim por diante com 34, 39, 48 e 60 dias.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos Quadros 1 a 4 são apresentados os dados relativos às contagens de *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Verifica-se que não houve diferença constante entre as contagens feitas no rizoplan e na rizosfera, razão pela qual apresentamos nas figuras valores médios entre as contagens de rizoplan e rizosfera. Da mesma forma, os cálculos estatísticos foram feitos com estas médias.

Verifica-se em primeiro lugar que em todos os tratamentos houve melhor desenvolvimento de *Beijerinckia* que de *Azotobacter*.

O desenvolvimento deste último variou mais com os tratamentos, demonstrando maior sensibilidade a fatores do solo, o que confirma trabalhos anteriores

QUADRO 1. Efeito do sorgo, da calagem e do nitrogênio no número de *Azotobacter* spp. no solo (Microcolônias/1 g de solo)

	Tratamento		Tempo após o plantio do sorgo em dias					
	Calcário	Nitrogênio	13	21	34	39	48	60
Sem planta	—	—	390	70	10	20	10	30
	+	—	1430	2000	1540	1000	2420	1000
	—	+	0	0	0	0	30	0
	+	+	1400	940	0	0	540	0
Com planta	—	— Rp <sup>a</sup>	0	0	10	0	0	0
	—	— Rf <sup>b</sup>	350	0	20	70	0	0
	+	— Rp	1000	1080	1100	1000	1000	660
	+	— Rf	1000	1160	1940	1000	1400	1000
	—	+ Rp	0	210	0	0	20	0
	—	+ Rf	0	300	0	0	30	0
	+	+ Rp	300	1160	60	1000	840	60
	+	+ Rf	1000	1450	0	1400	780	290

a — "Rizoplan"

b — "Rizosfera"

QUADRO 2. Efeito do sorgo, da calagem e do nitrogênio no número de *Beijerinckia* spp. no solo (Microcolônias/1 g de solo)

	Tratamento		Tempo após o plantio do sorgo em dias					
	Calcário	Nitrogênio	13	21	34	39	48	60
Sem planta	—	—	1530	1210	1260	1870	3080	0
	+	—	—	—	1550	2750	3730	1000
	—	+	90	80	880	150	200	1160
	+	+	—	2090	1600	1050	3650	120
Com planta	—	— Rp <sup>a</sup>	1920	750	3660	6600	3800	2540
	—	— Rf <sup>b</sup>	2320	2410	2220	5200	4000	3780
	+	— Rp	—	3240	5720	5600	2270	2000
	+	— Rf	—	2970	3430	4570	3900	1000
	—	+ Rp	1490	3640	1430	4040	1400	2900
	—	+ Rf	1140	0	1590	3200	1650	2500
	+	+ Rp	—	440	5440	3410	5000	2500
	+	+ Rf	—	3460	3000	3260	3200	2200

a — "Rizoplan"

b — "Rizosfera"

QUADRO 3. Efeito do sorgo, da calagem e do nitrogênio sobre o pH do solo

	Tratamento		Tempo após o plantio de sorgo em dias					
	Calcário	Nitrogênio	13	21	34	39	48	60
Sem planta	—	—	4,40	4,45	4,60	4,55	4,80	4,00
	+	—	6,40	5,65	6,85	6,70	6,50	5,70
	—	+	4,40	4,40	4,60	4,40	4,45	4,30
	+	+	6,60	5,75	4,65	4,55	5,15	4,10
Com planta	—	—	4,50	4,50	4,50	4,60	4,65	4,60
	+	—	5,80	5,10	5,30	6,25	5,75	5,90
	—	+	4,60	4,15	4,15	4,50	4,50	4,45
	+	+	5,85	5,20	4,60	5,20	5,20	4,80

QUADRO 4. Análise de variância dos Quadros 1, 2 e 3

Fontes de variação	G.L.	<i>Azotobacter</i> F	<i>Beijerinckia</i> F	pH F
Total.....	47			
Épocas.....	5	2,77*	2,45	1,60
Planta.....	1	0,50	14,95**	1,65
Calcário.....	1	97,56**	6,26*	76,62**
Nitrogênio.....	1	16,85**	8,19*	17,13**
Planta X Calcário.....	1	0,24	0,92	1,16
Planta X Nitrogênio.....	1	3,50	0,70	1,49
Calcário X Nitrogênio.....	1	7,10**	2,31	8,12**
Erro.....	36			

(Döbereiner 1959). Nestes estudos tinha sido observada a ocorrência de *Azotobacter* em apenas 9% das amostras de solos de vários Estados, enquanto *Beijerinckia* ocorreu em 58%.

A calagem teve efeito altamente significativo no desenvolvimento de *Azotobacter* aumentando seus números várias vezes, o que tinha sido esperado em virtude do pH baixo (4,4) do solo e da sensibilidade conhecida de *Azotobacter* à acidez. O efeito muito menos pronunciado, mas ainda significativo, do calcário no desenvolvimento de *Beijerinckia* está de acordo com as observações de Becking (1961) de que esta bactéria é relativamente resistente a solos ácidos, já havendo no entanto algum decréscimo de sua ocorrência em solos com pH abaixo de 5,0.

Tinha sido esperado o efeito negativo do nitrogênio no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, pois estimula outros grupos de microorganismos que entram em competição. Aqui, como foi dito acima, *Azotobacter* sofreu mais esta concorrência especialmente no solo com calcário (interação Calcário x N).

O efeito das plantas foi altamente significativo nas contagens de *Beijerinckia* não se observando tal efeito do sorgo no desenvolvimento de *Azotobacter* (Fig. 1, 2 e 3) a não ser na presença do calcário e do nitrogênio (Fig. 4) onde se observa durante todo ciclo maiores números de *Azotobacter* nos vasos plantados com sorgo. Este efeito poderia ser explicado por uma redução do nitrogênio solúvel no

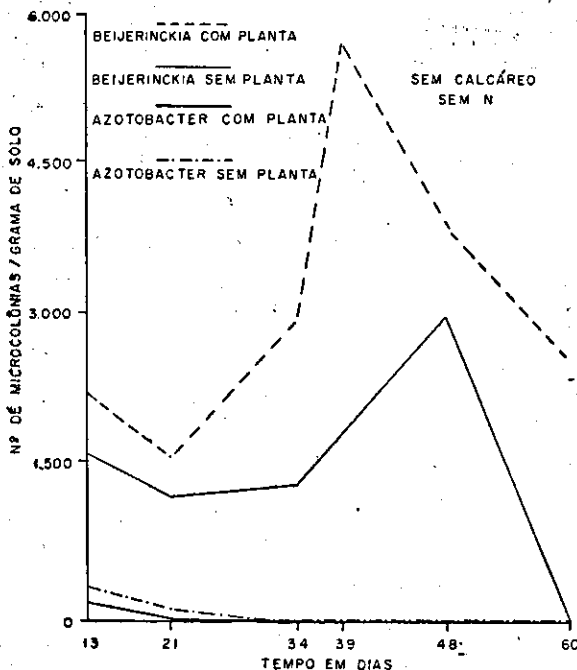


FIG. 1. Influência da planta nas populações de *Azotobacter* e *Beijerinckia* no solo sem calagem nem adubação nitrogenada. (Leia-se "calcário")

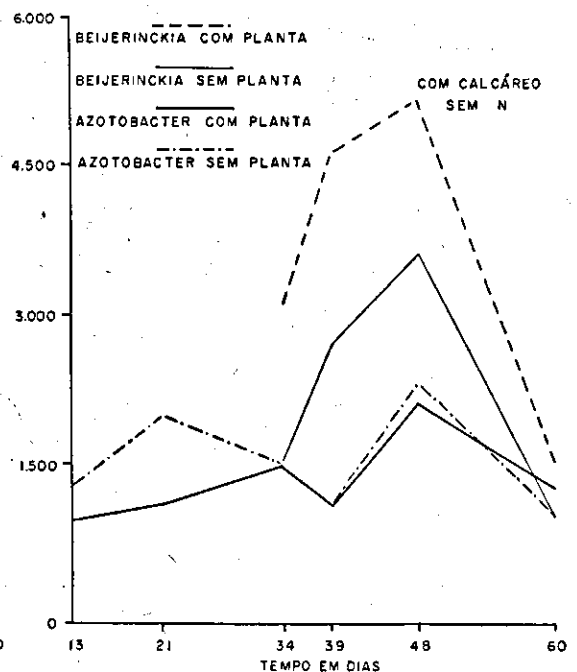


FIG. 2. Influência da planta nas populações de *Azotobacter* e *Beijerinckia* no solo com calagem e sem adubação nitrogenada.

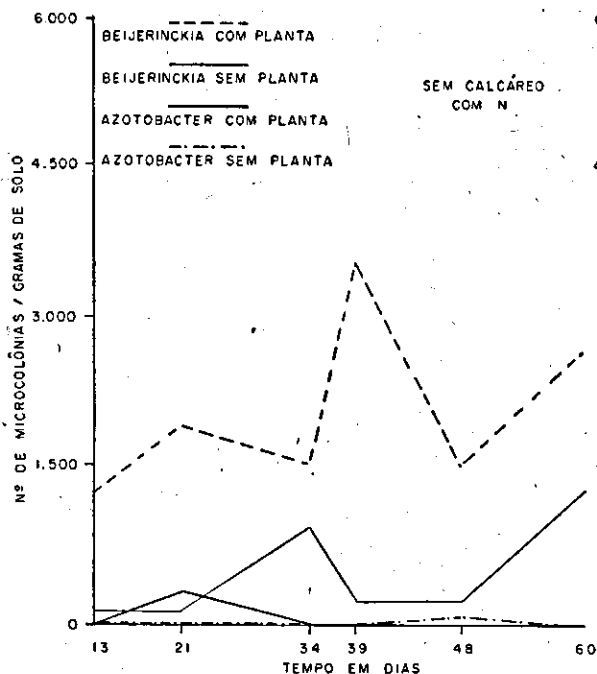


FIG. 3. Influência da planta nas populações de *Azotobacter* e *Beijerinckia* no solo sem calagem mas com adubação nitrogenada.

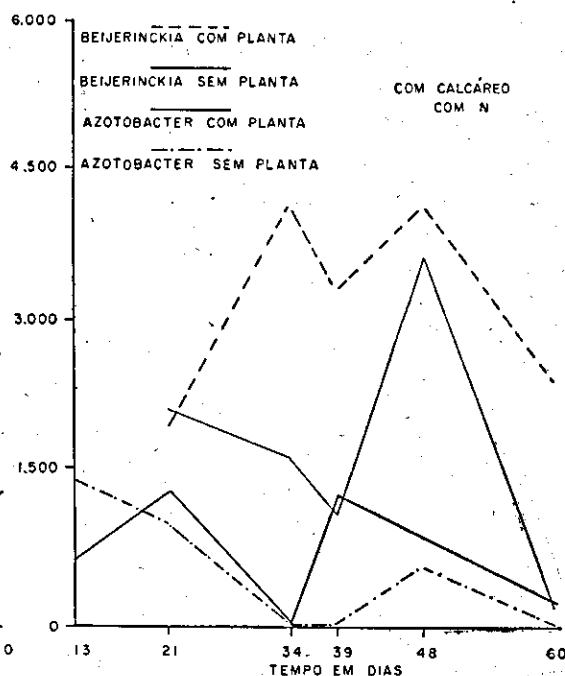


FIG. 4. Influência da planta nas populações de *Azotobacter* e *Beijerinckia* no solo com calagem e adubação nitrogenada.

solo, que as plantas utilizam, e pelas substâncias excretadas nas raízes. Enquanto efeitos favoráveis de plantas sobre espécies do gênero *Azotobacter* se limitaram a casos específicos (Rovira 1963, Döbereiner 1966) o efeito de gramíneas no desenvolvimento de *Beijerinckia* já tem sido patenteado no caso da cana de açúcar (Döbereiner & Alvahydo 1959), do arroz (Ruschel & Döbereiner 1961) e no de várias gramíneas forrageiras (Ruschel & Döbereiner 1965). O sorgo se coloca assim como mais uma gramínea neste grupo. Tendo sido o milho a única gramínea pesquisada que não exerceu efeito favorável no *Beijerinckia* (Ruschel & Döbereiner 1961) podia ter havido dúvidas a este respeito tomando em consideração a semelhança entre o milho e o sorgo.

Ruschel e Döbereiner (1961) sugeriram que o equilíbrio microbiano na rizosfera de plantas diferentes talvez seja dependente da maior ou menor quantidade e da natureza das substâncias excretadas, as quais dependeriam por sua vez do equilíbrio nutricional da planta. Maior excreção de substâncias nitrogenadas de uma planta suprida com excesso de N acarretará estímulo de outros microorganismos diferentes dos fixadores de N. Se estas excreções contêm aminoácidos o pH da rizosfera tenderá a aumentar devido à amônia liberada. Segundo esta hipó-

tese o oposto acontecerá na rizosfera de uma planta em estado de nutrição deficiente de N, onde excreções de açúcares e ácidos orgânicos abaixariam o pH; enquanto *Beijerinckia* encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento na rizosfera de plantas deficientes de N pois nestas tanto o pH mais baixo

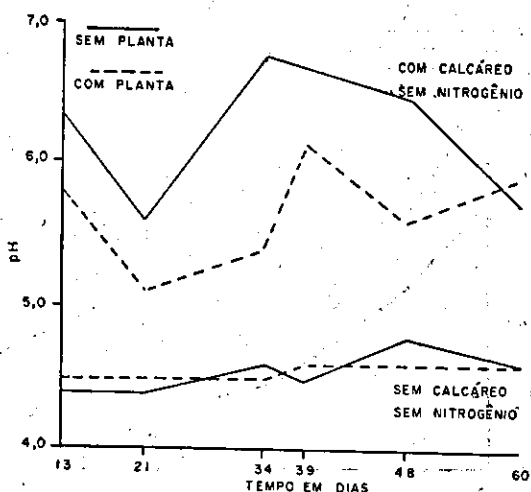


FIG. 5. Influência da planta sobre o pH do solo com calagem mas sem adubação nitrogenada, e no solo sem calagem e sem adubação nitrogenada.

como a falta de N limitarão microorganismos concorrentes, o mesmo não acontecerá com *Azotobacter* que é sensível à acidez.

Os resultados do presente trabalho suportam a hipótese levantada naquele, não só pelo efeito estimulante ao *Beijerinckia* que não se manifestou no caso do *Azotobacter*, mas ainda pelas modificações do pH. Como o arroz naquele trabalho, neste, o sorgo tendeu a baixar o pH do solo nos vasos sem adubação nitrogenada não tendo no entanto o efeito da planta sido significativo (Fig. 5). Nos vasos com nitrogênio este efeito diminuiu com o prosseguimen-

to do experimento tornando-se contrário após 34 dias, quando a planta aumentou o pH (Fig. 6 e 7).

Com a progressão do experimento, o abaixamento do pH nos vasos com adubação nitrogenada, foi ainda mais pronunciado na presença do calcário (interação  $Ca \times N$ ) e provavelmente se deve à nitrificação da amônia adicionada com adubo. Este efeito foi independente da planta mas poderia explicar o efeito especificamente prejudicial do N no desenvolvimento de *Azotobacter* nos vasos com calagem (interação  $Ca \times N$ ).

## REFERÊNCIAS

- Batista, C. A. 1965. Comunicação pessoal.
- Becking, J. A. 1961. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical distribution in soils. *Plant Soil*. 14:49-81.
- Bezerra, A. S. 1963. Ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* Derx. em solos do nordeste. IX Congr. Bras. Ciên. Solo, Fortaleza.
- Döbereiner, J. & Castro, A. F. 1965. Ocorrência e capacidade de fixação de nitrogênio de bactérias do gênero *Beijerinckia* nas séries de solos da área territorial do CNEPA. Bol. 16, Inst. Ecol. Exp. Agric., Rio de Janeiro. 18 p.
- Döbereiner, J. 1959. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns estados do Brasil. *Rev. bras. Biol.* 19:151-160.
- Döbereiner, J. & Alvahydo, R. 1959. Sobre a influência da cana de açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. *Rev. bras. Biol.* 19:401-412.
- Döbereiner, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. agropec. bras.*, 1:357-382.
- Galli, F. 1955. Métodos para a determinação da presença de *Azotobacter chroococcum* no solo. *Rev. da Agricultura, Piracicaba*, 30:163-172.
- Galli, F. 1956. Ocorrência de *Azotobacter chroococcum* em alguns solos de Piracicaba. *Rev. da Agricultura, Piracicaba*, 30:145-156.
- Rovira, A. D. 1963. Microbial inoculation of plants I. Establishment of freeliving nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato and wheat. *Plant and Soil* 19:304-314.
- Ruschel, A. P. 1959. A presença e capacidade de fixação das bactérias do gênero *Beijerinckia* em alguns solos do Nordeste. VII Congr. Bras. Ciên. Solo, Piracicaba.
- Ruschel, A. P. & Döbereiner, J. 1961. Equilíbrio microbiano na rizosfera de arroz, feijão e milho. *Bol. Téc.* 14, Inst. Ecol. Exp. Agric., Rio de Janeiro. 14 p.
- Ruschel, A. P. & Döbereiner, J. 1965. Bactérias assimióticas fixadoras de nitrogênio na rizosfera de gramíneas forrageiras. *An. IX Congr. Int. Pastagens* 2:1103-1107.
- Ruschel, A. P. & Britto, D. P. P. de S. 1966. Fixação assimiótica do nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. *Pesq. agropec. bras.* 1:65-90.
- Vancura, V. & Macura, J. 1961. The effect of root excretion on *Azotobacter*. *Folia microbiol.* 6:250-259.

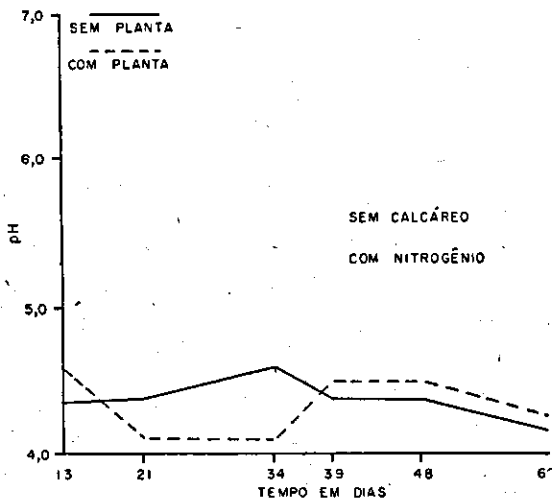


FIG. 6. Influência da planta sobre o pH do solo sem calagem mas com adubação nitrogenada.

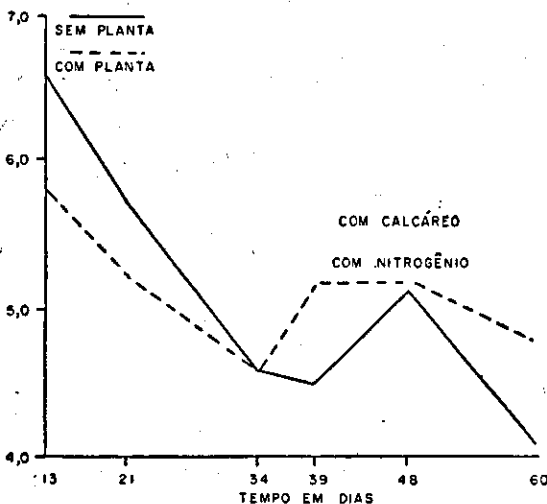


FIG. 7. Influência da planta sobre o pH do solo com calagem e adubação nitrogenada.

SURVIVAL OF NON-SYMBIOTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF SORGHUM (*Sorghum vulgare* Pers.)*Abstract*

A greenhouse experiment was conducted to study the influence of sorghum (*Sorghum vulgare*) plants, liming and nitrogenous fertilization on *Azotobacter* and *Beijerinckia* population in an acid soil. This experiment included combinations of the basic treatments: pots with and without plants, with and without lime and with and without nitrogenous fertilizer. All the pots received the same fertilization with phosphorus, potassium and minor elements, as well as inoculations with several species of *Azotobacter* and *Beijerinckia*.

The study of the influence of these treatments was made by counting the microcolonies of bacteria growing on silical-gel plates in consecutive periods.

Liming stimulated *Azotobacter* growth which almost disappeared in the unlimed pots (pH 5.0). The sorghum did not affect the development of *Azotobacter*, except in the pots with lime and with N. Nitrogenous fertilizing was harmful to *Azotobacter* and *Beijerinckia* alike. Liming stimulated *Beijerinckia* growth but less than that of *Azotobacter*. Sorghum strongly stimulated *Beijerinckia* growth, a confirmation of experiments made with other grasses. Nitrogenous fertilization caused a fall in the pH of the soil in the pots treated with lime.