

FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO EM ALGUMAS GRAMÍNEAS E NA TIRIRICA PELAS BACTÉRIAS DO GÊNERO *Beijerinckia* Derox¹

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL² e DISCE PINTO PACCA DE SOUZA BRITTO³

Sumário

Realizou-se este experimento com a finalidade de pesquisar a influência das bactérias assimbióticas de nitrogênio atmosférico, do gênero *Beijerinckia* Derox, na rizosfera dos capins Jaraguá (*Hiparrhenia rufa*) (Nees) (Stapf), Colônião (*Panicum maximum* Jacq.), grama Forquilha (*Paspalum notatum* Flugge) e também da Tiririca (*Cyperus rotundus* L.).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, usando-se parcelas subdivididas. Com os resultados obtidos concluiu-se que a inoculação com bactérias assimbióticas fixadoras de nitrogênio é uma prática possível em nossas condições no solo e nas plantas em estudo.

Maior quantidade dessas bactérias foi encontrada no "rizoplan" da grama Forquilha. Observou-se ainda, que o nitrogênio percentual da planta foi maior na grama Forquilha que nos capins Jaraguá e Colônião.

Relativamente ao nitrogênio percentual do solo, notou-se que no "rizoplan" dos capins Jaraguá e Colônião e da Tiririca foi maior que na grama Forquilha.

INTRODUÇÃO

A eficiência da fixação assimbiótica do nitrogênio é assunto controverso (Döbereiner & Ruschel 1961), havendo correntes que a julgam eficiente e outras que a têm como ineficiente.

Em trabalho recente (Döbereiner & Ruschel 1961), conseguimos chegar a resultados positivos em relação a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* em arroz; o mesmo obteve Döbereiner com cana-de-açúcar (Döbereiner 1959, 1961, Döbereiner & Alvahydo 1959).

Parker (1957b) notou que um solo cultivado com gramíneas continha mais nitrogênio que o mesmo sem vegetação, atribuindo este aumento à fixação assimbiótica através dos microorganismos. Em nossos trabalhos de laboratório, notamos que na rizosfera de uma gramínea do gênero *Paspalum* muito comum nos gramados existentes na área do Km 47 da Rodovia Rio-São Paulo, e na Tiririca (*Cyperus rotundus* L.), as bactérias do gênero *Beijerinckia* apareciam em grande abundância, principalmente no "rizoplan" (solo aderido às raízes). Como observamos que estas plantas, apesar de vegetarem na mesma área há mais de 10 anos sem nenhuma adubação, apresentavam-se

sempre com bom aspecto vegetativo, sem ter sido verificada deficiências de nitrogênio nas mesmas, suspeitamos serem as bactérias fixadoras de nitrogênio a principal fonte deste elemento que estas plantas utilizavam.

Para efeito de comparação, tomamos outras plantas da mesma família: *Paspalum notatum* Flugge (grama Forquilha), *Panicum maximum* Jacq. (capim Colônião) e *Hiparrhenia rufa* (Nees) Stapf. (capim Jaraguá), e também *Cyperus rotundus* L. (Tiririca).

Este trabalho traz apenas uma contribuição ao problema da fixação assimbiótica do nitrogênio pelas bactérias do gênero *Beijerinckia*, elucidando alguns pontos controversos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho encerra resultados da análise microbiológica e química de um experimento em casa de vegetação.

O experimento foi realizado com solo da Série Ecologia, série esta que possui dois tipos de solo: arenoso e areno-limoso.

O trabalho foi realizado em potes, contendo cada um 3,5kg de solo arenoso, de pH 4,5, sem nenhuma adubação, isto é, em condições normais de desenvolvimento das plantas que ocorrem na região.

O delineamento experimental foi de parcelas subdivididas, no qual as parcelas foram ocupadas pelos tratamentos: inoculação e sem inoculação; e as subparcelas representam os tratamentos: a) Solo testemunha (sem vegetação), b) Capim Jaraguá. c)

¹ Boletim Técnico n.º 13 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Eng.º Agrônomo do IPEACS, Km 47, Campo Grande, Rio de Janeiro.

³ Eng.º Agrônomo do IPEACS e Assistente de Ensino Superior da Escola Nacional de Agronomia da Universidade Rural do Brasil, km 47, Campo Grande, Rio de Janeiro.

QUADRO 1. Número de microcolônias de *Beijerinckia* por grama de solo em quatro repetições, em quatro épocas e média de pH do solo em todos os tratamentos

Época	Solo Testemunha s/vegetação		Capim Jaraguá		Capim Colônia		Grama Forquilha		Tiririca	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
1.ª.....	5100	170	8210	1020	7100	620	5780	5000	5200	1140
2.ª.....	7815	125	1650	645	6810	440	7885	5160	7150	3240
3.ª.....	5020	110	4805	372	7350	410	7845	4460	5950	600
4.ª.....	2490	140	620	430	1355	500	3660	4895	1540	170
Soma.....	20425	545	15285	2467	22615	1970	25150	19515	19840	5150
pH.....	4,55	4,55	5,30	5,16	5,40	5,30	5,02	5,10	5,07	5,12

I Inoculação; T Sem inoculação.

Capim Colônia, d) grama Forquilha, e) Tiririca. O plantio foi com pequenas mudas colhidas em campo do mesmo solo usado no experimento.

Fizemos a inoculação das mudas imergindo o sistema radicular em uma solução contendo colônias dispersas de *Beijerinckia* recém-isoladas do "rizoplan" das plantas em aprêço; ao solo testemunho com inoculação, incorporamos o mesmo inoculante, misturando bem.

Foram feitas contagens de *Beijerinckia* em quatro diferentes épocas: oito dias, um mês, dois meses e quatro meses, após o plantio. As contagens de *Beijerinckia* foram realizadas em placas de sílica-gel impregnadas com 0,1g de solo do "rizoplan" peneirado a 1mm. No solo testemunha sem vegetação a contagem foi feita colhendo uma amostra do próprio solo.

Foram realizadas análises do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, do teor de carbono pelo método de Tiurin e do pH do solo pelo potenciômetro EIL, medido em suspensão 1:1 em água.

RESULTADOS

Observa-se nos Quadros de 1 a 6 os resultados obtidos.

No Quadro 2 pode ser verificada a alta significação estatística para a inoculação, podendo ser apreciado o comportamento do efeito da inoculação no Quadro 1.

QUADRO 3. Teor de nitrogênio percentual do solo e médias da relação carbono/nitrogênio, em todos os tratamentos

Época	Solo Testemunha s/vegetação		Capim Jaraguá		Capim Colônia		Capim Forquilha		Tiririca	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
1.ª.....	0,035	0,035	0,223	0,188	0,129	0,129	0,035	0,117	0,129	0,141
2.ª.....	0,035	0,058	0,200	0,188	0,176	0,211	0,035	0,105	0,153	0,211
3.ª.....	0,070	0,023	0,200	0,058	0,117	0,153	0,082	0,058	0,176	0,141
4.ª.....	0,023	0,011	0,153	0,082	0,082	0,129	0,047	0,047	0,105	0,023
Soma.....	0,163	0,127	0,776	0,516	0,504	0,622	0,199	0,327	0,563	0,516
C/N.....	8,0	10,5	2,7	5,5	6,7	4,3	11,0	6,3	3,3	5,9

I Inoculado; T Sem inoculação.

QUADRO 2. A análise de variância relativa ao número de microcolônias de *Beijerinckia*, em quatro épocas

F. Variação	G. L.	Q. M.
Inoc.....	1	13.598,21 d
Repet.....	3	91,25 e
Resíduo (a).....	3	3,01
Trat.....	4	1.365,20 e
Trat. X Inoc.....	4	796,96 e
Resíduo (b).....	24	78,67
Época.....	3	995,49 e
Época X Inoc.....	3	618,60 e
Época X Trat.....	12	140,28 b
Época X Trat. X Inoc.....	12	87,36
Resíduo (c).....	90	64,26

a Os dados originais transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

b Significação ao nível de 5%

c Significação ao nível de 1%

d Significação ao nível de 0,1%

Assim o total de microcolônias em todos os tratamentos inoculados foi de 103.315 para 29.647 nos não inoculados, diferença bastante apreciável.

Com relação ao comportamento dos capins Jaraguá e Colônia, grama Forquilha e Tiririca, quanto ao número de microcolônias encontradas no "rizoplan" dos mesmos, pode-se observar que o capim Forquilha apresentou maior quantidade de *Beijerinckia*, estatisticamente diferenciada dos demais.

Relativamente às épocas de contagens de microcolônias, somente a contagem realizada quatro meses após o plantio foi estatisticamente inferior às realizadas com oito dias, um mês e dois meses após o plantio, não tendo havido diferença significativa entre estas três últimas.

Como vemos, o nitrogênio percentual do solo foi maior nos tratamentos inoculados, excetuando-se o caso do Forquilha e Colônia, crescendo ainda, que a Forquilha apresentou quantidade quase igual à do tratamento testemunha.

As maiores relações C/N foram as dos tratamentos com grama Forquilha e testemunha (sem vegetação).

QUADRO 4. Análise de variância de nitrogênio percentual do solo nos vários tratamentos*

F. Variação	G. L.	Q. M.
Inoc.....	1	3,2890
Repet.....	3	74,0848
Resíduo (a).....	3	33,8769
Trat.....	4	236,0341 *
Trat. X Inoc.....	4	27,6043 *
Resíduo (b).....	24	8,0011

* Dados originais transformados $\text{ang} = \text{arc sen } \sqrt{\text{Porcentagem}}$

Vê-se, no Quadro 4, que houve diferença significativa para tratamentos e para interação Trat. x Inoc.

O estudo feito relativamente à interação significativa, mostrou que a inoculação somente influenciou relativamente a nitrogênio percentual do solo, quando este foi cultivado com capim Jaraguá.

Quanto à significação estatística para tratamentos, pode-se concluir que o nitrogênio percentual do solo do "rizoplan" dos capins Jaraguá e Colônião e da Tiririca apresentou-se superior ao nitrogênio percentual do "rizoplan" da grama Forquilha.

QUADRO 5. Nitrogênio percentual da parte aérea dos capins Jaraguá e Colônião, grama Forquilha e da Tiririca

Capim Jaraguá		Capim Colônião		Grama Forquilha		Tiririca	
I	T	I	T	I	T	I	T
0,246	0,223	0,329	0,318	0,400	0,294	0,542	0,542
0,224	0,306	0,259	0,259	0,400	0,377	0,530	0,542
0,259	0,200	0,259	0,330	0,400	0,318	0,553	0,424
0,259	0,224	0,294	0,283	0,353	0,329	0,412	0,447
0,988	0,953	1,141	1,190	1,553	1,318	2,037	1,955

I Inoculação; T Sem inoculação.

Observando o Quadro 5, nota-se que de um modo geral, não houve diferença entre os tratamentos inoculados e sem inoculação, a não ser para a grama Forquilha.

QUADRO 6. Análise de variância do nitrogênio percentual da parte aérea dos tratamentos já mencionados*

F. Variação	G. L.	Q. M.
Inoc.....	1	10,2038
Repet.....	3	8,7094
Resíduo (a).....	3	37,3782
Trat.....	3	354,0798 *
Trat. X Inoc.....	3	8,6075
Resíduo.....	18	6,4117

* Os dados originários foram transformados $\text{ang} = \text{arc sen } \sqrt{\text{Porcentagem}}$

Verifica-se no Quadro 6 que somente houve significação estatística para tratamentos, indicando a Tiririca como possuidora de maior percentagem de nitrogênio na parte aérea da planta, vindo em seguida a grama Forquilha.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados e sem inoculação, assim como para a interação Trat. x Inoc.

Com relação ao número de *Beijerinckia* encontrado no "rizoplan" dos tratamentos, observou-se que a grama Forquilha apresentou maior quantidade destas bactérias fixadoras de nitrogênio do solo.

Maior quantidade de nitrogênio percentual, encontrou-se no solo do "rizoplan" dos capins Jaraguá, Colônião e da Tiririca.

Quanto ao nitrogênio percentual da parte aérea da planta, observa-se que a Tiririca mostrou-se mais rica, seguida da grama Forquilha.

Também pode ser observado no Quadro 1 que a população de *Beijerinckia* no "rizoplan" da grama Forquilha, mesmo no tratamento não inoculado, ainda foi grande relativamente aos demais.

DISCUSSÃO

White *et al.* (1958) e Whitt (1941) demonstraram que os ganhos de nitrogênio no solo somente são apreciáveis nos solos de campinas ou de prados. Alguns autores (Pochon & Barjac 1958) acham possível obter bons resultados na fixação assimbiótica do nitrogênio, adicionando-se ao solo substâncias orgânicas. No entanto, malgrado tôdas as objeções de ordem teórica recentes, a fixação do nitrogênio atmosférico é uma realidade no solo e reveste-se de grande importância (Pochon & Barjac 1958). Com efeito, as opiniões contraditórias se conciliam quando admitem que esta fixação do nitrogênio atmosférico pelas bactérias não simbióticas pode ser razoável nas zonas de culturas intensivas, importante numa cultura extensiva e primordial nas imensas superfícies do globo não cultivadas pelo homem (Pochon & Barjac 1958).

Parker (1957b) e Whitt (1941) conforme já foi citado, demonstram que provavelmente as gramineas são uma das principais plantas que podem favorecer a fixação do nitrogênio pelas bactérias assimbióticas.

De acôrdo com os resultados do presente trabalho, acredita-se que existem plantas que excretam substâncias favoráveis ao desenvolvimento das bactérias do gên. *Beijerinckia*, provocando uma certa afinidade, para não dizer simbiose, entre a bactéria e a planta. Segundo Parker (1953), a evolução da simbiose entre algumas plantas e microorganismo, foi se dando paulatinamente, havendo diferentes estágios de aproximação entre ambos. Citando o caso da simbiose *Rhizobium*-Leguminosa, diz que inicialmente bactéria e planta viviam independentemente, passando depois um a se aproveitar das excreções do outro e finalmente adquirindo condições anatômi-

cas especiais para viverem em simbiose. No presente trabalho, a afinidade *Beijerinckia*-Gramínea seria um estágio intermediário, onde as trocas de substâncias excretadas por ambos podem ser aproveitadas por um e por outro, não sendo essas trocas, como na simbiose, extremamente necessária (caso do *Rhizobium*), podendo mesmo serem independentes, isto é, nenhum dos dois depende exclusivamente do outro para sua sobrevivência.

Apoiando esta hipótese, pode-se ver pelo Quadro 1, que o solo do "rizoplan" das plantas não inoculadas sempre apresentou maior número de *Beijerinckia* que o solo testemunha sem vegetação. Tudo indica que a grama Forquilha foi a que mais favoreceu o crescimento destas bactérias, pois em seu "rizoplan", a população de *Beijerinckia* superou sempre a dos demais tratamentos, diferenciando-se estatisticamente; segue-se a Tiririca que também estimulou o crescimento dessas bactérias fixadoras de nitrogênio e, depois, os capins Jaraguá e Colômbio como se verifica no Quadro 1, nos tratamentos sem inoculação. Também no primeiro quadro, observa-se que a população de *Beijerinckia* no "rizoplan" da grama Forquilha, mesmo no tratamento não inoculado, ainda foi grande relativamente aos demais; além disto todas as gramíneas aumentaram o número de *Beijerinckia*, quando não inoculadas (Inoc. x Trat.). Este efeito favorável de todas as gramíneas estudadas no desenvolvimento de *Beijerinckia* em sua rizosfera confirma resultados anteriores com cana-de-açúcar e arroz (Döbereiner & Alvaydo 1959, Döbereiner 1961, Döbereiner & Ruschel 1961). Sem este aumento seria em vão tentar-se qualquer prática agrícola que possa vir a aproveitar a fixação assimbiótica.

A elevação do pH no "rizoplan" das diferentes plantas pode ter contribuído para o aumento do número de *Beijerinckia*, nos tratamentos sem inoculação. Conforme observamos ainda no Quadro 1, as épocas de contagem mostraram diferenças significativas, o que vem confirmar observações de Daste (1958), que estudando as bactérias fixadoras na rizosfera notou períodos de estímulo e inibição segundo o estágio de desenvolvimento das plantas.

Estudando estatisticamente os resultados encontrados para o nitrogênio percentual da parte aérea do tratamento com grama Forquilha, através do teste "T", notamos diferenciação para o tratamento inoculado o que pode ser atribuído à fixação assimbiótica do nitrogênio.

O nitrogênio retido no solo (Quadro 3) foi proporcional à população de *Beijerinckia* no "rizoplan" das diferentes plantas, o que vem confirmar a idéia da afinidade *Beijerinckia*-planta. Estes re-

sultados nos levam à hipótese de que a maior fixação no *Paspalum*, talvez se devesse a troca de substâncias excretadas pelas raízes desta planta com o nitrogênio fornecido pela bactéria, sendo este absorvido totalmente pela planta, o mesmo não acontecendo, por exemplo, no "rizoplan" do Jaraguá. Esta planta parece não absorver o nitrogênio fixado pelas bactérias assimbióticas, ficando no solo, onde pode perder-se através da lixiviação, ou mesmo ser aproveitado por outros microorganismos, diminuindo o disponível para a planta. Por outro lado, sabe-se que a relação C/N elevada favorece a fixação de nitrogênio por via biológica (Dahr 1958). Assim, notamos que onde a relação C/N do solo era maior (Quadro 3), caso do tratamento com *Paspalum*, houve maior número de *Beijerinckia*, e maior fixação de nitrogênio, o que vem confirmar os resultados de Parker (1953), que obteve maiores ganhos de nitrogênio em solos cultivados com plantas não Leguminosas, em comparação com o solo sem planta, na razão de 15 Kg/ha, correlacionando estes ganhos com a relação C/N. No presente caso o *Paspalum* absorveu diretamente o nitrogênio, ficando a relação C/N maior.

CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

1. A inoculação favoreceu o crescimento de *Beijerinckia* no solo testemunha sem vegetação como também, no "rizoplan" das diferentes plantas estudadas, o que foi comprovado estatisticamente e nos leva a concluir ser a inoculação uma prática possível em nossas condições, no solo e nas plantas em estudo.
2. Todas as plantas estudadas aumentaram o desenvolvimento de *Beijerinckia* em seu "rizoplan", como se pode observar comparando-se a testemunha sem planta e sem inoculação com o mesmo tratamento nas culturas.
3. Houve um efeito mais pronunciado ainda dos tratamentos com grama Forquilha tanto no inoculado como no sem inoculação, o que evidencia o efeito benéfico desta planta sobre o crescimento, em seu "rizoplan", da bactéria em estudo.
4. Comparando-se os tratamentos inoculados nota-se menor influência no "rizoplan" do Jaraguá e Tiririca, no desenvolvimento de *Beijerinckia*. Interessante notar que estas plantas apresentaram maior teor de nitrogênio no solo do "rizoplan".
5. Já com o nitrogênio percentual da parte aérea das plantas, a relação do item 4 foi inversa, isto é, maior quantidade de nitrogênio percentual na

Forquilha e menor no Jaraguá, também significante estatisticamente. Nota-se ainda que na parte aérea da grama Forquilha quando inoculada o teor de nitrogênio era maior.

6. Nos tratamentos onde a relação C/N era maior, encontrou-se maior número de *Beijerinckia* e maior teor de nitrogênio na planta (caso da Forquilha).

REFERÊNCIAS

- Dahr, N. R. 1955. Ann. Agron. A. 6:133. (Citado por Pochon & Barjac 1958)
- Daste, P.R. 1950. Gén. Bot. 57:685. (Citado por Pochon & Barjac 1958)
- Döbereiner, J. 1959. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns estados do Brasil. Rev. Bras. Biol. 19:151-160.
- Döbereiner, J. 1961. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx. Rev. Bras. Biol. 21:397-407.
- 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. & Ruschel, A. P. 1961. Inoculação do arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do gên. *Beijerinckia* Derx. Rev. Bras. Biol. 21:397-407.
- Parker, C. A. 1953. Non-symbiotic nitrogen fixation and the nitrogen status of agricultural soils. Aust. Conf. Soil Sci. 1:361-366.
- Parker, C. A. 1957 a. Evolution of nitrogen fixing symbiosis in higher plants. Nature, 179:593-594.
- Parker, C. A. 1957 b. Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria in Soil. III - Total nitrogen changes in field soil. J. Soil Sci. 8:48-59.
- Pochon, J. & Barjac, H. 1958. Traité de microbiologie du sol. Dunod, Paris.
- White, J. W. et al. 1945. J. Ann. Soc. Agron. 37:21. (Citado por Pochon & Barjac 1958)
- Whitt, D. M. 1941. The role of bluegrass in the conservation of the soil and its fertility. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 6:309-311.

ASSYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN SOME GRASSES AND IN *Cyperus rotundus* BY BACTERIAE OF THE GENUS *Beijerinckia* Derx

Abstract

In a greenhouse experiment, the effect of nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx was studied in the rizosphere of the pasture grasses *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf, *Panicum maximum* Jacq., *Paspalum notatum* Flugge and of *Cyperus rotundus* L. Numbers of microcolonies of *Beijerinckia* were counted at four different stages of plants growth. The following conclusions were drawn:

1. Inoculation with *Beijerinckia* increased the number of these organisms in bare soil as well as on the "rhizoplan" of the grasses. This indicates that inoculation might be practicable under our conditions and with the studied plants.

2. Without inoculation all plants in this experiments increased the number of *Beijerinckia* in their "rhizoplan", when compared with the checks without plant growth.

3. This effect was still more pronounced in the case of *Paspalum notatum*, with and without inoculation.

4. The lowest number of *Beijerinckia* were found in the "rhizoplan" on *Hyparrhenia rufa* e *Cyperus rotundus*. These plants showed the highest N-content in the "rhizoplan" soil.

5. Higher N-contents in the aerial parts of *Paspalum*, however, were found than in those of *H. rufa*. Inoculated *Paspalum* plants contained more nitrogen than not inoculated ones.

6. Where the ratio C/N in the "rhizoplan" soil was higher more *Beijerinckia* were found and N-content of the plants was higher (*Paspalum*).