

## *Azotobacter paspali* sp. n., UMA BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO NA RIZOSFERA DE *Paspalum*<sup>1</sup>

JOHANNA DÖBEREINER<sup>2</sup>

### Sumário

Encontrou-se um novo microorganismo fixador de nitrogênio atmosférico no rizoplan e na rizosfera de *Paspalum plicatum* e *Paspalum notatum*, especialmente neste último vulgarmente conhecido como grama forquilha ou grama batatais. Entre 76 amostras de solo do rizoplan de *P. notatum*, apenas uma não continha a nova bactéria sendo seu solo o mais ácido dos pesquisados (pH 4.8). Oitenta e uma amostras do rizoplan de outras espécies de plantas incluindo cinco espécies de *Paspalum* foram tôdas negativas.

A bactéria em questão se enquadra no gênero *Azotobacter* mostrando como características diferenciais células filamentosas em culturas novas, aspecto peculiar das colônias em placas de sílica gel com citrato de cálcio e ainda a inabilidade de usar certos açúcares e o tartarato. Foi proposto o nome *Azotobacter paspali* sp. n.

Discutiu-se a possibilidade do novo microorganismo ocupar posição intermediária na evolução colocando-se entre bactérias assimióticas fixadoras de N e bactérias que agem na simbiose das leguminosas.

### INTRODUÇÃO

A ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico na rizosfera de plantas tem sido objeto de inúmeros estudos (Allison 1947, Krasilnikov 1958, Rubenchik 1963), pois na rizosfera há maior possibilidade de fornecimento de material energético necessário para a fixação do nitrogênio molecular.

Encontrou-se, em trabalhos anteriores uma população abundante de *Beijerinckia* spp. na rizosfera da cana de açúcar (Döbereiner 1959, 1961), do arroz (Döbereiner & Ruschel 1961) e de algumas gramíneas forrageiras (Ruschel & Döbereiner 1965). Entretanto espécies do gênero *Azotobacter* não têm sido encontradas em maior número na rizosfera de diversas plantas (Allison *et al.* 1947, Rovira 1963). Aumentos ocasionais desta bactéria na rizosfera têm sido atribuídos a efeitos indiretos através de produtos de decomposição de raízes mortas (Rubenchik 1963).

Ruschel e Britto (1966) foram os primeiros a notar ocorrência abundante de bactérias fixadoras de N na rizosfera de *Paspalum notatum* e Ruschel e Döbereiner (1965) notaram além de *Beijerinckia*, na rizosfera de *P. notatum* e *Cynodon plectostachyus*

números elevados de *Azotobacter*, mesmo em solos ácidos. A ocorrência de *Azotobacter* nestes casos foi atribuída a elevação do pH na rizosfera destas plantas.

*P. notatum* é uma gramínea de ocorrência espontânea em toda região Centro-Sul e Sul do Brasil vulgarmente conhecida como grama forquilha ou grama batatais, sendo planta invasora especialmente em solos de baixa fertilidade como os do cerrado. Espécies de *Paspalum* constituem um dos componentes principais dos pastos naturais do Rio Grande do Sul e do Uruguai sendo o *Paspalum notatum* dominante nos solos arenosos e lavados (Cetrângulo 1966).

No presente trabalho são apresentados estudos mais detalhados do *Azotobacter* que ocorre na rizosfera desta planta, chegando-se a conclusão que se trata de uma nova espécie que além de várias características diferenciais ainda parece específica para a rizosfera daquele vegetal.

### MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo da rizosfera e do rizoplan das diversas plantas foram retiradas com enxada esterilizada com álcool e preparadas no mesmo dia da seguinte maneira: as plantas foram colhidas com um bloco de solo, o qual após desprendimento por agitação, constituía a amostra da rizosfera. As amostras de solo do rizoplan (superfície da raiz) foram obtidas retirando-se com a mão esterilizada com álcool e seca a camada de solo aderente as raízes após rigorosa

<sup>1</sup> Este trabalho foi recebido para publicação em 21 de julho de 1966 e constitui o Boletim Técnico n.º 34 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Pesquisas e pela Aliança para o Progresso - Projeto de Pesquisas Ministério da Agricultura (Departamento de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias) e USAID - Brasil (Instituto de Pesquisas IRI).

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

limpeza para eliminar agregados maiores. Para estudos quantitativos este solo foi peneirado por uma peneira de 1 mm, pesado em balança analítica e 100 mg espalhados sobre cada placa de sílica gel. Nos estudos qualitativos, aproximadamente a mesma quantidade de solo foi distribuída diretamente das raízes sobre as placas. Nestas determinações a ocorrência esporádica de até três colônias por placa não foi considerada positiva.

As placas de sílica gel foram preparadas pelo método de Winogradsky usando-se a solução de sais com pH 6.5 e glicose ou citrato de cálcio como fonte de carbono.

O meio de cultura para os ensaios diversos foi o de Lipman modificado:

$K_2HPO_4$ .....	0.2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0.2 g
$CaCl_2$ .....	0.02 g
$FeCl_3$ sol. à 10% .....	1 gota
sacarose .....	10 ou 2 g
agar-agar .....	15 ou 2 g
$H_2O$ .....	1000 ml

Quando indicado no texto foram adicionados, por litro, 5 ml de solução alcoólica de azul de bromotimol à 0.5% ou 0.005 g de  $Na_2MoO_4$ .

No ensaio sobre o efeito do pH (Fig. 1) foi usado o seguinte meio:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0.125 g
$CaCl_2$ .....	0.200 g
$Fe_2(SO_4)_3$ .....	0.025 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$ .....	0.025 g
$Na_2MoO_4$ .....	0.005 g
sacarose .....	5.0 g
$H_2O$ .....	1000 ml

Os diferentes tampões para este meio foram obtidos através de relações crescentes de  $KH_2PO_4$ / $Na_2HPO_4$  na concentração de 0.047 M. Estes tampões foram suficientes para estabilizar o pH das culturas durante 7 dias, pois medições no final do ensaio mostraram que o pH em nenhum dos frascos desviou-se mais que 0.2 unidades do inicial.

O nitrogênio fixado foi determinado pelo método de Kjeldahl (semi-micro) com HgO como catalisador. Subtraiu-se o teor de N em frascos testemunhas do N-total em cada frasco.

Para os testes comparativos foram usadas culturas de *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. macrocystogenes* e *A. agilis* provenientes do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Argentina, e

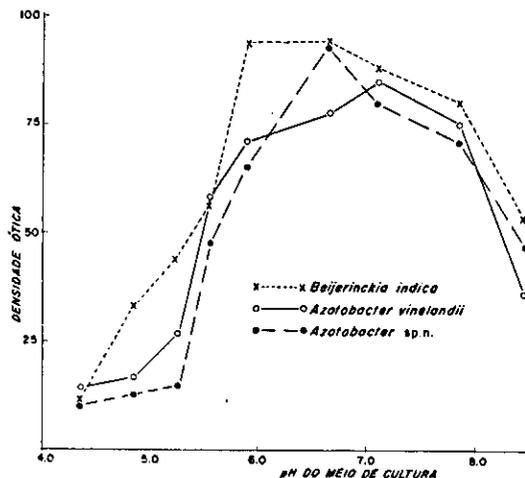


FIG. 1. Efeito do pH do meio de cultura no desenvolvimento de três microorganismos. Frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 20 ml de meio incubado durante 7 dias em temperatura ambiente no agitador mecânico (142 rpm). Meio de cultura tamponado com diferentes relações de  $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$  0.067 M. O pH final em nenhum dos frascos variou mais que 0.2 unidades do inicial.

enviadas por gentileza da Dr.<sup>a</sup> Nélida Giambiagi. As culturas de *Beijerinckia* spp. e de *Derxia* sp. tinham sido isoladas em nosso laboratório.

## RESULTADOS

### Ocorrência

Placas de sílica gel, impregnadas com solução de sais de Winogradsky e com citrato de cálcio como fonte de carbono, quando inoculadas com solo do rizoplan ou rizosfera de *Paspalum notatum* ou *P. plicatum*, apresentaram após cinco dias de incubação à 34°C colônias com características de um novo *Azotobacter*. Placas com tratamento igual porém inoculadas com culturas puras de *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis*, *A. macrocystogenes*, *Beijerinckia indica*, *B. fluminensis* ou *Derxia* sp. apresentaram aspecto diferente, enquanto as inoculadas com culturas puras do novo microorganismo apresentaram aspecto idêntico, àquelas inoculadas com solo da rizosfera de *P. notatum*. Ficou assim possível identificar a nova bactéria já nas placas de sílica gel.

A frequência de algumas espécies da família *Azotobacteriaceae* em amostras de solo provenientes do rizoplan de várias espécies forrageiras pode ser visto no Quadro 1. Verifica-se que 75 das 76 amostras provenientes do rizoplan de *Paspalum notatum* e duas das três amostras de *P. plicatum* continham *Azotobacter* sp. n. sendo que a única amostra do *P. notatum* negativa foi de um solo com pH 4.8. O rizoplan de qualquer das outras plantas estudadas,

QUADRO 1. Ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio no rizoplano de forrageiras

Planta	N.º de amostras analisadas	Amostras contendo					
		<i>A. chroococcum</i> <i>A. vinelandii</i>		<i>Azotobacter</i> sp. n.		<i>Derxia</i> sp.	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
<i>Paspalum notatum</i> .....	76	13	17	75	98	12	15
<i>Paspalum plicatum</i> ....	3	1	33	2	66	0	0
<i>Paspalum</i> spp. <sup>a</sup> .....	27	2	7	0	0	0	0
Outras gramíneas <sup>b</sup> ....	63	17	26	0	0	0	0
Leguminosa <sup>c</sup> .....	12	2	16	0	0	1	8
Outras famílias.....	10	4	40	0	0	2	20

<sup>a</sup>*P. Convezum*, *P. vaginatum*, *P. fasciculatum*, *P. maritimum*, *P. erianthum*.

<sup>b</sup>*Panicum mazimum*, *P. antidofali*, *P. clandestinum*, *P. coloratum*, *P. deustum*, *P. repens*, *P. bulbosum*, *Cynodon plectostachyus*, *Cynodon dactylon*, *Setaria sphacelata*, *S. longiseta*, *Melinis multiflora*, *Chloris distichophylla*, *Ch. gayana*, *Andropogon intermedius*, *A. gayanus*, *Aerocera macrum*, *Digitaria pentrii*, *D. decumbens*, *Pennisetum ciliare*, *Rottboellia selleana*, *Brachiaria dictyonera*, *Axonopus attenuatus*, *A. compressa*, *Tripsacum australe*, *Cytopogon citratus*, *Cortaderia argentea*, *Tripsacum dactyloides*, e outras espécies não identificadas.

<sup>c</sup>*Calopogonium macunoides*, *Lotus corniculatus*, *Medicago sativa*, *Centrosema pubescens*, *Pueraria javanica*, *Phaseolus arthropurpureus*, var. *siratro*, *Arachis glabrata*, *Chaetocalix habercarpa* e outras espécies não identificadas.

mesmo o das outras espécies de *Paspalum* não apresentou o novo microorganismo.

*Azotobacter chroococcum* e *A. vinelandii* ocorreram com menor freqüência mas em várias plantas. Nota-se, ainda no Quadro 1, em 15 amostras de solo, a ocorrência de *Derxia* sp. bactéria esta descrita por Jensen *et al.* (1960) mas ainda não confirmada na literatura.

No Quadro 2 encontra-se a análise quantitativa de algumas das amostras incluídas no Quadro 1, apresentando contagens de *Azotobacter* sp. n. em solo do rizoplan e da rizosfera. Na maioria das amostras do rizoplan de *Paspalum notatum* o número de microorganismos em questão era tão elevado que não foi

QUADRO 2. Ocorrência de *Azotobacter* sp.n. na rizosfera e rizoplan de três gramíneas forrageiras

Planta	pH do solo	N.º de microcolônias/g de solo	
		Rizoplan	Rizosfera
<i>Paspalum notatum</i> .....	5.3	180	0
>	0.2	> 1000	400
>	7.6	600	0
>	5.7	> 1000	180
>	4.8	0	0
>	7.8	> 1000	30
>	5.3	780	410
>	5.0	> 1000	190
>	5.2	450	160
>	5.4	> 1000	700
>	4.9	> 1000	> 1000
>	5.7	> 1000	260
>	5.0	> 1000	410
>	5.4	> 1000	210
>	5.2	> 1000	490
<i>Digitaria decumbens</i> .....	5.1	0	0
>	4.7	0	0
>	5.0	0	0
<i>Pennisetum purpureus</i> .....	6.0	0	0
>	5.5	0	0
>	5.2	0	0

possível sua contagem (mais que 100 colônias por placa). Todas as amostras da rizosfera continham menos *Azotobacter* sp. n. que as correspondentes do rizoplan. Enquanto todas as amostras do rizoplan de *Paspalum notatum* com pH acima de 4.8 continham *Azotobacter* sp. n., as amostras de outras gramíneas, mesmo quando em solo com pH 6.0 não o apresentaram.

#### Características culturais

Foram isoladas numerosas estirpes do novo organismo e selecionadas quatro para estudos mais detalhados.

Colônias em placas de sílica gel com citrato de cálcio e incubadas, à 34°C, aparecem normalmente no quinto dia. Ocasionalmente surgem colônias no quarto ou sexto dia não havendo no entanto um prazo prolongado de aparecimento de colônias como no caso de *Beijerinckia*. A parte inferior da camada de sílica gel começa amarelecer ficando o pigmento aparente em contraste com o citrato de cálcio branco na superfície da sílica gel. Logo em seguida, com a solubilização do citrato pela formação de pequenas colônias, aparecem numerosas áreas circulares e transparentes, que se alargam rapidamente, até que no sétimo dia após a inoculação todo o citrato é solubilizado desaparecendo também o pigmento amarelo.

Colônias em meio de agar sem N são brancas, semi-transparentes, redondas, úmidas e elevadas no princípio, mais tarde razas, secas e leitosas, freqüentemente irregulares. Em agar com azul de bromotimol o centro destas colônias toma coloração laranja dando às mesmas um aspecto muito característico.

Em meio líquido com glicose incubado sem agitação observa-se rápido desenvolvimento do organismo, resultando em flocos e tiras brancas que caem depositando-se no fundo do frasco. Forma-se ainda maior ou menor quantidade de um pigmento amarelo solúvel. Este pigmento não se observa quando os frascos são incubados no agitador. Todas as estirpes pesquisadas quando incubadas no agitador mecânico (142 rpm) produzem pigmento roxeado em meio líquido com citrato de cálcio.

#### Características morfológicas

Nos meios de cultura mais favoráveis, isto é, com glicose, sacarose, maltose e citrato de cálcio, em culturas de 24 hs de idade, as células se apresentam em forma de bastonetes de tamanho uniforme de  $1.2 \times 4 - 10 \mu$ , com citoplasma homogêneo e muito móveis (Fig. 2). As células crescem rapidamente formando após 48 hs. filamentos de comprimento

variado que em certas estirpes podem atingir até  $60\ \mu$  de comprimento (Figs. 3 e 4). Após três dias a cultura representa uma mistura de filamentos longos, bastonetes de todos os comprimentos e de cistos

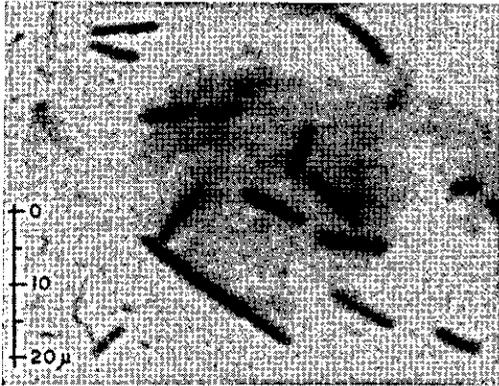


FIG. 2. *Azotobacter* sp.n. em meio líquido com sacarose com 24 horas de idade. Violeta Genciana. Obj. 100



FIG. 3. *Azotobacter* sp.n. em meio líquido com sacarose com 48 horas de idade. Violeta Genciana. Obj. 100

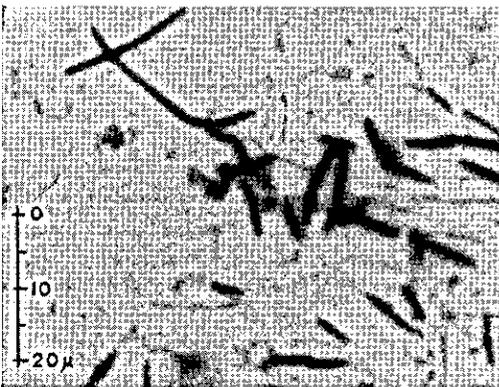


FIG. 4. *Azotobacter* sp.n. em meio líquido com sacarose com 3 dias de idade. Violeta Genciana. Obj. 100

redondos muito parecidos com os das espécies de *Azotobacter* conhecidas (Fig. 5 e 6). Tanto bastonetes de todos os comprimentos como filamentos até  $40\ \mu$  de comprimento movem-se ativamente com movimentos comparáveis aos de uma cobra na água. Bastonetes e filamentos são envolvidos em uma cápsula de muco.

Células em culturas mais velhas ou em meio de cultura menos favorável (como etanol, manitol, galactose) são parecidas com as das espécies de *Azotobacter* conhecidas.

O organismo é Gram negativo como todas as espécies de *Azotobacter*. Colorações com Violeta Genciana (sol. aq. à 0.05%) mostram células homogêneas quando novas e granuladas quando velhas. Nos filamentos aparecem cadeias de grânulos terminais que possivelmente dão origem aos cistos ou células curtas. Tentativas de coloração dos flagelos não tiveram sucesso.

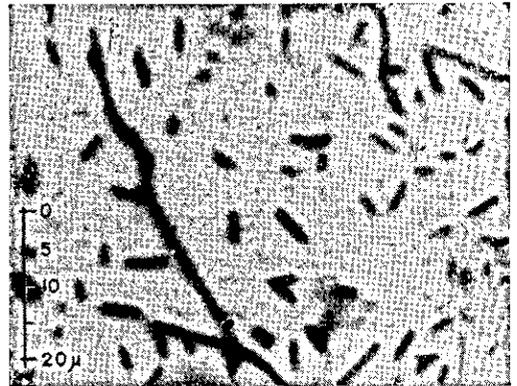


FIG. 5. *Azotobacter* sp.n. em meio líquido com sacarose com 4 dias de idade, mostrando grânulos terminais. Violeta Genciana. Obj. 100

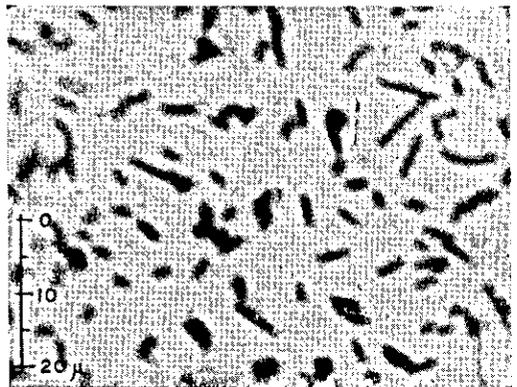


FIG. 6. *Azotobacter* sp.n. em meio líquido com sacarose com 8 dias de idade. Violeta Genciana. Obj. 100

## Características fisiológicas

O organismo não se desenvolve em calda nutritiva mesmo na presença de glicose. Leite de litmus não é modificado em 20 dias. Ótimo ou bom desenvolvimento é obtido em meio sem N (Lipman mod.) com glicose, sacarose, galactose, maltose, metanol, butanol, etanol, manitol, glicerol, lactato, acetato, citrato, amido e dextrina. Mal ou nenhum desenvolvimento se obtém no mesmo meio com arabinose, lactose, manose, levulose, tartarato, benzoato, oxalato e álcool amílico. Forte produção de ácido (amarelamento do agar com azul de bromotimol) é observado com glicose, sacarose, galactose, maltose, metanol, etanol, manitol, amido e dextrina. Em glicerol e butanol apesar de bom desenvolvimento a produção de ácido varia com as estirpes. Produção de ácido com os sais sódicos ou cálcicos dos ácidos orgânicos não ficou aparente pois se houve, foi neutralizada pelo cation liberado à medida que o ácido foi sendo usado.

Em relação ao oxigênio o organismo se comporta como as outras espécies de *Azotobacter*, necessitando mais oxigênio que o gênero *Beijerinckia*. O efeito da agitação no desenvolvimento de algumas espécies pode ser visto nos Quadros 3 e 4. Verifica-se que tanto desenvolvimento como fixação de N do nôvo organismo são acelerados pela aeração do meio, o mesmo não acontecendo com *Beijerinckia*.

QUADRO 3. Efeito da aeração no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, em meio de cultura<sup>a</sup>

Espécie	Agitador mecânico <sup>c</sup>		Sem agitação	
	D.O. <sup>b</sup>	pH final	D.O.	pH final
<i>A. vinelandii</i> .....	351	6.3	100	6.0
<i>Azotobacter</i> sp.n. (Ax-4).....	189	5.0	129	5.7
<i>Azotobacter</i> sp.n. (Ax-8).....	165	5.0	140	5.4
<i>Beijerinckia indica</i> (B-7).....	130	4.6	144	5.2
<i>Beijerinckia indica</i> (B-8).....	111	4.8	136	5.4

<sup>a</sup>Frascos de Erlenmeyer de 125ml contendo 50ml de meio com 1% de sacarose; incubação de 10 dias em temperatura do ambiente.

<sup>b</sup>Densidade ótica medida num colorímetro Klett Summerson com filtro n.º 54 (520-540).

<sup>c</sup>142 rpm.

QUADRO 4. Efeito da aeração na fixação de nitrogênio por *Azotobacter* sp.n. em meio de cultura<sup>a</sup>

<i>Azotobacter</i> sp.n.	mg N fixado/lg sacarose		
	Ax-3	Ax-4	Ax-5
Agitador mecânico <sup>b</sup> 24h/dia.....	5.1	6.0	6.2
Agitador mecânico 5h/dia.....	4.3	3.7	4.0
Agitador manual 2x/dia.....	3.4	2.7	3.3
Sem agitação.....	3.2	2.9	4.2

<sup>a</sup>Frascos de Erlenmeyer de 125ml contendo 50ml de meio com 0.2% de sacarose. Incubado em temperatura do ambiente durante 7 dias.

<sup>b</sup>142 rpm.

Temperaturas bastante elevadas proporcionaram ótimo desenvolvimento do nôvo organismo. Os dados apresentados no Quadro 5 mostram que tanto as colônias de *Azotobacter* sp. n. como as de *Derzia* sp. apareceram mais rapidamente e em maior número quando incubados em 37°C do que quando incubados em 34°C.

QUADRO 5. Efeito da temperatura e da fonte de carbono no desenvolvimento de *Azotobacter* sp.n. e de *Derzia* sp.<sup>a</sup>

Temp.	Espécie	Citrato de Ca		Glucose	
		4 dias	5 dias	4 dias	5 dias
29.°C	<i>Azotobacter</i> sp.n.....	50	140	0	0
	<i>Derzia</i> sp.....	30	30	20	20
34.°C	<i>Azotobacter</i> sp.n.....	250	> 1000	0	10
	<i>Derzia</i> sp.....	30	30	10	10
37.°C	<i>Azotobacter</i> sp.n.....	600	> 1000	0	0
	<i>Derzia</i> sp.....	50	60	10	10

<sup>a</sup>Placas de sílica gel inoculadas com 100mg de solo do rizoplan de *Paspalum notatum*: Os dados representam número de microcolônias/lg e médias de 2 placas.

O organismo mostrou uma faixa relativamente estreita de tolerância ao pH do meio. Na Fig. 1 se pode comparar o efeito do pH do meio no desenvolvimento de várias espécies. O nôvo organismo mostrou ótimo crescimento em pH 6.6 não tendo mostrado desenvolvimento abaixo do pH 5.5, enquanto o pH ótimo é mínimo para *Azotobacter vinelandii* e *Beijerinckia indica* que foram 7.1 e 5.2 para o primeiro e 5.9 e 4.8 para o segundo respectivamente.

A paralização do crescimento de *Azotobacter* sp. n., quando pela própria produção de ácido o pH 5.2 foi atingido, ainda ficou aparente nos dados

QUADRO 6. Efeito da capacidade de neutralização do meio de cultura na fixação de N por *Azotobacter* sp.n. e *Beijerinckia indica* (médias de duas repetições)<sup>a</sup>

Relação K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.02%)	pH inicial	<i>B. indica</i>		<i>Azotobacter</i> sp.n.	
		mg N/100ml	mg N/100ml	D.O.	pH final
4:0	7.35	7.3	1.8	172	5.2
3:1	7.30	12.1	3.1	248	5.2
2:2	7.20	12.2	0.5	126	5.1
1:3	7.00	9.5	0.0	72	5.2

<sup>a</sup>Frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 25ml de meio com 1% de sacarose incubados durante 15 dias com agitação manual uma vez por dia, em 30.°C. A sacarose não terminou em nenhum dos frascos.

apresentados no Quadro 6. Neste ensaio não deve ter sido o pH inicial mas sim a neutralização pelo meio, da acidez produzida, que foi responsável pela diferença entre os tratamentos, pois o crescimento, em todos terminou quando o pH 5.2 foi atingido. Este foi uniforme em todos os frascos, enquanto o desenvolvimento e o nitrogênio fixado variou com os tratamentos. A fixação de N por *Beijerinckia* foi menos afetada pelos tratamentos, provavelmente porque o

pH baixo resultante de seus produtos metabólicos não afetou seu desenvolvimento.

No Quadro 7 são apresentados os resultados de um ensaio de fixação de N comparando como substratos a sacarose com e sem neutralização e o citrato de cálcio o qual por si já neutraliza a produção de acidez do microorganismo. Pelo valor energético a fixação de 1 g de sacarose deveria ser aproximada-

QUADRO 7. Efeito da fonte de carbono e da neutralização do ácido produzido na fixação de N de 5 organismos (mg N fixado/100ml de meio)<sup>a</sup>

Espécie	Sacarose			Citrato de Ca	
	1%	0.2%	0.2% neutral <sup>b</sup>	1%	0.2%
<i>B. indica</i> .....	2.24	--	--	0.62	--
<i>A. vinelandii</i> .....	2.16	--	--	2.11	--
<i>A. sp.n. (Ax-3)</i> .....	1.74	1.53	3.07	4.54	0.80
<i>A. sp.n. (Ax-4)</i> .....	1.14	1.68	3.06	3.50	0.76
<i>A. sp.n. (Ax-5)</i> .....	1.24	1.28	3.52	5.16	0.83
<i>A. sp.n. (Ax-8)</i> .....	1.44	1.60	2.68	3.24	0.62

<sup>a</sup>Erlenmeyer de 125ml contendo 50 ml de meio com azul de bromotimol; incubação em temperatura ambiente em agitador mecânico (142 rpm), durante 15 dias.

<sup>b</sup>Neutralizado diariamente com NaOH 0.1 N esterilizado para a cor original do meio (verde).

mente três vezes superior àquela de 1 g de citrato de cálcio. Isto realmente se verifica (Quadro 7) comparando-se os frascos com citrato à 0.2% com os de sacarose da mesma concentração e neutralizadas. Porém o mesmo não aconteceu nos frascos não neutralizados onde a sacarose rendeu menor fixação. Como dito anteriormente, isto indica que onde houve neutralização a acidez resultante do metabolismo limitou o desenvolvimento do organismo e consequente fixação de N. O mesmo raciocínio explica o fato de haver maior fixação com citrato do que com sacarose nos frascos não neutralizados na concentração de 1%. Nos mesmos quadros ainda pode-se verificar que *A. vinelandii* foi menos favorecido pela neutralização porque sua produção de ácido é pequena e ainda que *Beijerinckia* não se desenvolveu em meio com citrato.

A capacidade de fixação de N do novo organismo foi comparável a das outras espécies de *Azotobacter*

QUADRO 8. Fixação de nitrogênio em meio de cultura com molibdênio (médias de duas repetições)<sup>a</sup>

Espécie	mg N fixado/1g sacarose
<i>Beijerinckia indica</i> .....	9.2
<i>Azotobacter vinelandii</i> .....	30.6
<i>Azotobacter sp.n. (Ax-4)</i> .....	8.5
<i>Azotobacter sp.n. (Ax-5)</i> .....	20.6
<i>Azotobacter sp.n. (Ax-8)</i> .....	30.4

<sup>a</sup>Frascos de Erlenmeyer de 125ml com 50ml de meio com 0.2% de sacarose incubado durante 8 dias em temperatura ambiente no agitador mecânico (142 rpm). O meio contém 0.0005% de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

(Quadros 4, 6, 7 e 8). Os valores obtidos no ensaio apresentado no Quadro 8, foram os maiores. A fixação relativamente baixa nos outros ensaios deve-se a falta de Mo no meio de cultura usado nos mesmos.

## DISCUSSÃO

Nos dados apresentados nos Quadros 1 e 2 verifica-se que *Azotobacter sp. n.* foi encontrado apenas no rizoplan de duas espécies do mesmo gênero, isto é, em *Paspalum notatum* e *P. plicatum*.

O primeiro ocorre com muita freqüência na região Centro-Sul e Sul do Brasil e no Uruguai sendo conhecida como planta invasora em solos pobres especialmente no cerrado. Devido as suas poucas exigências ela é usada como grama para gramados artificiais que são conhecidos por manterem aspecto verde e sadio, sem jamais ter recebido adubação.

Nenhuma outra planta analisada apresentou esta bactéria em sua rizosfera (Quadro 2). Por outro lado, praticamente todas as amostras provenientes do rizoplan de *Paspalum notatum* e duas das três amostras do rizoplan de *Paspalum plicatum* continham a referida bactéria e quase sempre em grande abundância.

A especificidade de um *Azotobacter* para a rizosfera de uma certa planta sugere relações mais íntimas entre planta e bactéria do que as conhecidas nas outras espécies fixadoras de N assimióticas na rizosfera de plantas como por ex. a de *Beijerinckia* na rizosfera da cana de açúcar (Döbereiner 1959, 1961). Lembra aquela convivência da simbiose das leguminosas.

Derx, já em 1953 sugeriu que a causa da limitação da distribuição de *Beijerinckia* à solos tropicais seja ligada a distribuição de certas espécies de plantas das quais a bactéria depende. Sugeriu este autor ainda que neste caso, nos trópicos se acharia o bêrço da evolução da simbiose de bactéria com plantas superiores, isto é, que as bactérias simbióticas do gênero *Rhizobium* constituiriam uma etapa mais avançada da evolução, a partir das assimióticas tendo-se especificado cada vez mais para as condições de seu macrosimbionte até não serem mais capazes de fixar N atmosférico sem ajuda da planta superior. Parker (1957) sugeriu um caminho de evolução parecido, e chegou a basear sua hipótese recente sobre o "side" da fixação de N nos nódulos de leguminosas neste caminho de evolução (Parker *et al.* 1965). Chamam estes autores a fase intermediária imaginada entre fixação assimiótica e a simbiose das leguminosas verbalmente "a loose association in the cortex". Apesar de não termos ainda observações concretas sobre o mecanismo da associação entre *Paspalum*

*notatum* e *Azotobacter* sp. n., é grande a tentação de considerá-la àquela fase intermediária imaginada por Parker *et al.* (1965).

Entretanto, se está sendo demonstrado no presente trabalho o efeito favorável de uma planta no desenvolvimento da bactéria, provavelmente por fornecer material energético para esta, somente se prova a contribuição de um dos dois participantes de uma possível simbiose. Resta demonstrar a contribuição do outro, isto é, a fixação de nitrogênio em quantidades apreciáveis na rizosfera da planta e sua transformação em formas aproveitáveis pela mesma. Não temos ainda dados concretos neste sentido mas podemos supor que este seja o caso, pois demonstramos que o desenvolvimento da bactéria em questão sempre foi acompanhado de fixação de N em meio de cultura sem nitrogênio (Quadros 4, 6, 7 e 8). O teor relativamente elevado de N de *Paspalum notatum* quando comparado com outras gramíneas (Ruschel e Britto 1966) e o fato daquela gramínea ser considerada planta invasora em solos de baixa fertilidade, como certas leguminosas, ainda falam em favor de uma fixação de N na rizosfera de *Paspalum* e seu posterior aproveitamento pela planta.

Não é fácil compreender a razão da dependência do desenvolvimento, no solo, de *Azotobacter* sp. n. de uma certa planta, pois a mesma bactéria pode ser cultivada com facilidade em meios de cultura sintéticos, não sendo seu desenvolvimento dependente de substâncias complexas, de vitaminas ou amino ácidos. Segundo Rovira (1962) excreções de raízes de diversas plantas são mais abundantes em condições de temperaturas e intensidades de luz elevadas. Segundo o mesmo autor substâncias as mais diversas são excretadas, controlando a planta com elas a microflora de sua rizosfera. Neste caso o *Paspalum* excretaria substâncias que estimulam especificamente o novo organismo, ou então são inibidoras a outros grupos normalmente abundantes na rizosfera de outras plantas.

O novo microorganismo apesar de requerer uma faixa de pH bastante estreita, em meio de cultura, ocorreu em abundância no rizoplan de *Paspalum notatum* até em solo com pH 4.9 (Quadro 2). Entretanto, medidas do pH do solo do rizoplan desta planta mostraram repetidamente, e principalmente em solos muitos ácidos, valores mais altos que os do solo da rizosfera ou de amostras testemunhas. Até que ponto os números de *Azotobacter* sp. n. contadas na rizosfera correspondem a realidade é difícil dizer pois pelo método usado não se podia excluir a possibilidade de caírem partículas do solo do rizoplan na amostra da rizosfera.

### Posição do novo microorganismo na sistemática

Pela caracterização da família *Azotobacteriaceae* apresentada em Bergey's Manual (1957), o novo organismo se enquadra nesta família. Não sendo hoje em dia mais aceitável a existência de um só gênero com três espécies, propomos seja aceita a sugestão de Jensen (1960) pela qual a família contém os três gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia* e *Derxia*. O novo organismo pode ser enquadrado no gênero *Azotobacter* não só pela forma das células, sua habilidade de formar cistos e sua sensibilidade à acidez, mas ainda pelas características fisiológicas apresentadas no Quadro 9.

O novo microorganismo distingue-se de *A. chroococcum* e *A. vinelandii* pela inabilidade de usar o benzoato de sódio, mesmo na concentração de 0.2% (Quadro 9) e de *A. agilis* pela formação de cistos. O organismo não pode ser idêntico à *A. insignis* des-

QUADRO 9. Quadro comparativo das características fisiológicas de espécies da família *Azotobacteriaceae*<sup>a</sup>

Espécie	Citrato	Etanol	Galactose	Benzoato	Tartarato
	Acetato Lactato 1%	Metanol Butanol 1%	Levulose Mannose 1%	0.2%	1%
<i>Beijerinckia indica</i> .....	0	0	+	0	+
<i>B. flumensis</i> .....	0	0	+	0	+
<i>Azotobacter chroococcum</i> ...	+	+	+	+	+
<i>A. vinelandii</i> .....	+	+	+	+	+
<i>A. agilis</i> .....	+	+	+	0	+
<i>A. macrocystogenes</i> .....	+	+	+	0	+
<i>Azotobacter</i> sp.n.....	+	+	0	0	0
<i>Derxia gummosa</i> <sup>b</sup> .....	0	0 <sup>c</sup>	0	0	0
<i>Derxia</i> spd.....	+	0	0	0	+

<sup>a</sup>Em meio Lipman modificado.

<sup>b</sup>Cultura original enviada por gentileza do Prof. H. L. Jensen.

<sup>c</sup>Estes resultados estão em desacôrdo com a descrição do autor. (Jensen *et al.* 1960) onde etanol deu bom desenvolvimento.

<sup>d</sup>Seis estirpes de *Derxia* sp. isolados de solos da região.

crita por Derx em 1951 pois não apresenta as duas características diferenciais citadas por este autor, isto é, flagelos polares visíveis no campo escuro e a incapacidade de usar glicose e manitol. Entre tôdas as espécies de *Azotobacter* descritas o novo *Azotobacter* se assemelha mais à *A. macrocystogenes* (Jensen 1955) o qual também não usa benzoato, forma cistos, produz ácido e apresenta polimorfismo. As formas irregulares de *A. macrocystogenes* no entanto nem sempre se apresentam em filamentos e somente aparecem em culturas velhas e em certos meios de cultura desfavoráveis, representando por isto formas de involução. Em culturas novas, à forma típica deste organismo se apresenta como coccus ou diplococcus, formando tétrades, sendo imóveis e completamente diferentes dos bastonetes e filamentos extremamente móveis de *Azotobacter* sp. n. Este ainda não apresenta a tolerância à acidez de *A. macrocys-*

*togenes* e forma pigmento amarelo com açúcares em contraste com o pigmento rosa daquele.

Além das características citadas, o nôvo microorganismo se distingue ainda de tôdas as espécies conhecidas de *Azotobacter* pelas seguintes características diferenciais:

1. Crescimento característico em placas de sílica gel com citrato de cálcio incubado à 34°C: após 4 a 5 dias amarelecimento da sílica gel e aparecimento de colônias pequenas que solubilizam o citrato.

2. Forma filamentososa da bactéria na fase de desenvolvimento logarítimo que não pode ser confundida com formas de involução.

3. Não usa arabinose, lactose, manose, levulose e tartarato.

Propõe-se para o nôvo microorganismo o nome *Azotobacter paspali* sp. n. pelo fato de ter sido encontrado exclusivamente no rizoplan e rizofera de duas espécies do gênero *Paspalum*.

#### AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Eng.º Agrônomo Alaidés Puppín Ruschel, da Seção de Solos do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS), aos estagiários Maria de Fátima Alves, do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Norte, Belém, Pará, Eli Sydey Lopes, do Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, e ao aluno do 4.º ano da Escola Nacional de Agronomia, Gabriel Luiz Seraphico Peixoto da Silva, pela colaboração no isolamento e na caracterização do nôvo microorganismo. Agradece ainda aos laboratoristas Lincoln Cordeiro de Castro e Ricardo Werthein Tavares de Macedo pela assistência nos trabalhos de laboratório e de campo. Merece ainda menção a colaboração do Eng.º Agrônomo Sebastião Manhães Souto do IPEACS que colocou a nossa disposição a coleção de plantas forrageiras da Seção de Agrostologia, e a do Professor Roberto Alvahydo, na discussão e interpretação deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- Allison, F.E. 1947. *Azotobacter* inoculation of crops. I. Historical. *Soil Sci.* 64:413-429.
- Allison, F.E., Gaddy, W.L., Pink, L.A. & Aringer, W.H. 1947. *Azotobacter* inoculation. II. Effect on crops under green-house conditions. *Soil Sci.* 64:489-497.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. 7.ª ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Cetrângulo, B. 1966. Comunicação pessoal.
- Derx, H. G. 1951. *Azotobacter insigne* esp. nov., fixateur d'azote à flagellation polaire. *Kon. Nederl. Akad. Wetenschappen Proc., Ser. C*, 14:1-10.
- Derx, H. G. 1953. Sur les causes de la distribution géographique limitée des *Beijerinckia*. VI Congr. Intern. Microb., Roma, 6:354-355.
- Döbereiner, J. 1959. Influência da cana de açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *Rev. bras. Biol.* 19:251-258.
- Döbereiner, J. 1961. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil* 15:211-216.
- Döbereiner, J. & Ruschel, A. P. 1961. Inoculação do arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* Derx. *Rev. bras. Biol.* 21:397-407.
- Jensen, M.L. 1955. *Azotobacter macrocystogenes* n. sp., a nitrogen fixing bacterium resistant to acid reaction. *Act. Agric. Scand.* 2-3:278-294.
- Jensen, H. L., Petersen, E.J., De, P.K. & Roma Bhattacharya 1960. A new nitrogen fixing bacterium: *Dexia gummosa* nov. gen. nov. sp. *Arch. Microb.* 36:182-195.
- Krasil'nikov, N.A. 1961. Soil microorganisms and higher plants. Israel Program for Scientific Translations. US-Dpt. Comm., Washington. 474 p.
- Parker, C.A. 1957. Evolution of nitrogen fixing symbiosis in higher plants. *Nature* 179:593-594.
- Parker, C.A., Kennedy, I.R. & Kidby, D.K. 1965. Carbon and nitrogen metabolism in the leguminous nodule. Symposium on Rhizobium, its relationship to form and function in the legume nodule. Hobart, Australia.
- Rovira, A.D. 1962. Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. *Soils and Fertilizers* 15:167-172.
- Rovira, A.D. 1963. Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato and wheat. *Plant and Soil* 19:304-315.
- Rubenchik, L. I. 1963. *Azotobacter* and its use in agriculture. Israel Program for Scientific Translations. US-Dpt. Comm., Washington. 278 p.
- Ruschel, A.P. & Britto, D.P.P.S. 1966. Fixação assimbiótica do nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. *Pesq. agropec. bras.* 1:65-69.
- Ruschel, A.P. & Döbereiner, J. 1965. Bactérias assimbióticas fixadoras de N na rizofera de gramíneas forrageiras. IX Congr. Intern. Pastagens, São Paulo.

#### *Azotobacter paspali* sp.n. A NITROGEN FIXING BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF *Paspalum*

##### Abstract

A new nitrogen fixing bacteria was found to occur in large numbers on the root surface (rhizoplan) and less abundant in the rhizosphere of *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatum*. Seventy five out of 76 soil samples from the root surface of *P. notatum*, and two out of three soil samples from *P. plicatum* contained the new organism. Two root surface soil samples each from *P. convexum*, *P. vaginatum*, *P. fasciculatum*, *P. maritimum*, and *P. erianthum* did not contain the new bacteria. Also soil samples from the root surface of 81 other pasture plants, including more than 32 species of the family *Gramineae*, 8 species of the family *Leguminosae*, and other plants not identified, were all negative.

The new bacteria was found in soils with a wide pH range (4.9 to 7.8) although in culture medium good growth was obtained only above the pH 5.5. There is normally a higher pH on the root surface of *Paspalum notatum* than in a surrounding acid soil.

The new organism can be easily identified on silica-gel plates with calcium citrate, inoculated with appropriated soil by a yellow soluble pigment and numerous small colonies which solubilize the calcium citrate. On N-free agar medium with brom-thymol-blue, colonies are characteristically flat with a deep orange center.

In liquid N-free medium, rapid growth occurs which precipitates in flocks and settles to the bottom.

A yellow soluble pigment is formed (not by all strains, however) when incubate without shaking.

A violet to brown pigment is formed in liquid medium with calcium citrate when incubated on a rotary shaker.

In liquid medium with sucrose, growth stopped when pH 5.2 was reached by the acid production of the proper organism. When the medium was neutralized or when calcium citrate was used as carbon source, growth continued until all of the substrate was used.

In suitable culture medium (N-free medium with glucose, sucrose, maltose or calcium citrate), after 24 hours the organisms appear as uniform, very motile rods of  $1.2 \times 4 - 10 \mu$ . The cells grow rapidly and after 48 hours filaments of varying sizes become visible which may reach a length of 60  $\mu$  or more. After three days the culture represents a mixture of rods and filaments of all sizes and of cysts which are much like those of the known *Azotobacter* species.

The organism is Gram negative and stains with Gentian Violet (0.05%) show homogeneous plasma in young cells and granulated plasma in older cultures. The filaments often show chains of terminal granules.

There was no growth of the organism in litmus milk or nutrient broth even in the presence of glucose. Good growth was observed in N-free medium with glucose, sucrose, galactose, maltose, methanol, ethanol, butanol, mannitol, glicerol, lactate, acetate, citrate, starch and dextrin. Little or no growth was observed with arabinose, lactose, mannose, laevulose, tartarate, benzoate, oxalate and amylic alcohol. Acid production was observed with all substances that gave good growth except the salts of the acids.

The organism showed best growth at quite high temperatures, 37°C being better for the development on silica gel plates than 34°C.

The nitrogen fixing capacity in culture medium was comparable with that of other *Azotobacter* spp., 30.4 mg N/1 g sucrose being the highest value observed.

Following the given characteristics the bacteria was placed in the genus *Azotobacter*. It differed from all known species of this genus by the following features:

1 - Characteristic growth on silica gel plates with calcium citrate as carbon source and incubated at 34 to 37°C. After 4 to 5 days yellowing of the silica-gel followed by the appearance of numerous small colonies which solubilize the citrate and give the impression of many little holes.

2 - Filamentous form of young cells during the logarithmic growth phase which can not be confounded with involution forms.

3 - Inability to use arabinose, lactose, mannose, laevulose and tartarate.

Due to the fact that the new organism was found exclusively on the roots of two species of *Paspalum* the name *Azotobacter paspali* sp.n. is proposed.

The possibility of this *Azotobacter* representing the intermediate step in the evolution of the legume symbiosis from nonsymbiotic nitrogen fixers, is discussed.

During the studies for this paper, in 15 soil samples, another organism was observed to occur on the root surface of several plants. Its was identified as *Derxia* sp. probably the species recently described by Jensen, as occurring in Indian soils.