

ESTUDOS COMPLEMENTARES SÔBRE A FISIOLOGIA DE *Azotobacter paspali* E SUA DEPENDÊNCIA DA PLANTA (*Paspalum notatum*)¹

WALTER COUTINHO MACHADO² e JOHANNA DÖBEREINER³

Sinopse

Foram feitos vários experimentos para elucidar melhor a especificidade do efeito de *Paspalum notatum* sôbre o desenvolvimento de *Azotobacter paspali*.

Em condições de campo, estudou-se a ocorrência de *A. paspali* na rizosfera e no rizoplan de *Cynodon dactylon* e *Hyparrhenia rufa* consorciadas do *Paspalum notatum*, observando-se diminuição destas bactérias no rizoplan daquelas gramíneas, o que confirma o efeito específico de *P. notatum*.

Num experimento de vasos estudou-se o efeito do solo, de calcário e da planta (*P. notatum*) no desenvolvimento de *A. paspali*. O solo colhido sob vegetação de *Paspalum notatum* foi mais favorável ao desenvolvimento da bactéria que a areia, apesar de ter pH mais baixo. A calagem dêste solo favoreceu ainda mais o desenvolvimento da bactéria, embora o pH não tenha demonstrado papel tão importante como o encontrado nos ensaios em meio de cultura. Nos vasos com planta a bactéria se desenvolveu melhor que nos sem planta, e, no rizoplan, melhor que na rizosfera, tendo sido estas diferenças mais pronunciadas nos tratamentos com areia que nos com solo.

Ensaio de laboratório em meio de cultura líquido visaram estudar o efeito do pH e do exsudato radicular de *P. notatum* no desenvolvimento de *A. paspali*. Observou-se bom desenvolvimento apenas na faixa do pH 6,7 a 7,0. O efeito favorável do exsudato de raízes aumentou com sua concentração até 200% da solução original. As substâncias ativas do exsudato foram resistentes à esterilização a 120°C por 30 minutos o que exclui a possibilidade de serem de natureza enzimática.

INTRODUÇÃO

Diversos são os fatores que influem na possibilidade da ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera e no rizoplan das plantas. Entre estes pode-se citar pH, tipo de solo, aeração, presença ou ausência de determinados minerais, etc. Segundo Rovira (1962, 1965), a natureza das substâncias secretadas pelas raízes é a responsável pela composição da microflora de sua rizosfera.

Vários autores trabalhando com diversos vegetais das regiões de clima temperado encontraram efeitos ora favoráveis, ora desfavoráveis das secreções radiculares na ocorrência das diversas espécies de *Azotobacter*, e estes efeitos variaram também em função da fase de crescimento do vegetal, devido, talvez, a variações na natureza das substâncias secretadas (Matura 1966, Pantos 1956).

Em regiões de clima tropical, estudos sôbre a ocorrência de bactérias fixadoras de N na rizosfera de várias plantas apresentaram aspectos ainda mais interessantes. A cana-de-açúcar, o arroz e certas gramíneas forrageiras mostraram efeitos estimulantes no desenvolvimento de *Beijerinckia* (Döbereiner 1959, Döbereiner & Ruschel 1962, Ruschel & Brito 1966). Em 1966 Döbereiner descreveu uma nova espécie fixadora de nitrogênio ocorrendo especificamente na rizosfera e rizoplan de duas gramíneas do gênero *Paspalum* (*P. notatum* e *P. plicatum*) e denominou-a *Azotobacter paspali*.

Com a finalidade de melhor compreendermos a especificidade da influência destas gramíneas no desenvolvimento de *A. paspali*, foram feitos os estudos apresentados no presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho pode ser dividido em três partes:

Estudo da ocorrência

Determinamos a presença de *A. paspali* em 14 amostras de gramíneas de gêneros outros que não o

¹ Recebido em 14 de junho de 1968 e aceito para publicação em 14 de julho de 1968.

Boletim Técnico n.º 75 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Aluno do 4.º ano da Escola de Agronomia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

³ Eng.º Agrônomo da Seção de Solos do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Paspalum e que ocorrem associadas com êste nos solos da região. As amostras foram colhidas com um bloco de solo, o qual, após desprendimento por agitação, constituía a amostra da rizosfera. As amostras de solo do rizoplan foram obtidas retirando-se com a mão esterilizada em álcool e seca, a camada de solo aderente às raízes após rigorosa limpeza para eliminar os agregados maiores.

O solo foi peneirado em peneira de 1 mm e 100 mg distribuídos em placas de sílica-gel impregnadas com solução de Winogradsky (pH 6,5) com citrato de cálcio como fonte de carbono (Döbereiner 1966). Foram usadas 2 placas por amostra.

O pH foi determinado com potenciômetro Beckman na suspensão de solo/água 1:1.

Experimentos de vasos

Montamos um experimento em blocos ao acaso com 4 repetições e com os tratamentos de plantio de mudas esterilizadas e sem esterilizar, inoculadas e sem inoculação, em tôdas as combinações possíveis e com as respectivas testemunhas, feitos em solo, solo com calcário e areia.

O solo usado foi o da série Ecologia, colhido numa área cuja vegetação dominante é *Paspalum notatum*, e a areia lavada foi proveniente do Rio Guandu. A quantidade de solo ou de areia usada nos diversos potes foi de 2,2 kg. Nos tratamentos com calcário, adicionamos a quantidade de 0,836 g de carbonato de cálcio por pote, quantidade esta que por análise anterior seria suficiente para se obter o pH 6,0.

Usamos como adubação as seguintes dosagens por kg de solo ou areia: KH_2PO_4 - 0,175 g; NH_4NO_3 - 0,010 g. Elementos menores - 1 ml da seguinte solução:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,500 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3,950 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,227 g
H_3BO_3	0,250 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,000 g
Ácido cítrico	5,000 g
H_2O	250,000 ml

As mudas de *Paspalum notatum*, após convenientemente limpas, sofreram, para esterilização, os seguintes tratamentos: imersão em álcool etílico comercial durante 3 minutos, imersão em sublimado corrosivo (HgCl_2) a 1:500 durante 6 minutos e, finalmente, lavagem abundante em água corrente.

Para os tratamentos com inoculação usamos a quantidade de 5 ml de cultura líquida por pote de uma mistura de 4 estirpes de *A. paspali*.

Instalado o experimento, êste ficou cêrca de 6 meses em casa de vegetação. Durante êste período fizemos 2 contagens do número de *A. paspali* no solo, solo da rizosfera e rizoplan como descrito no estudo de ocorrência. Tiramos a seguir o experimento da casa de vegetação e uma última contagem foi feita 15 dias após estarem os vasos expostos a condições naturais.

Ensaio de laboratório

Foram feitos os seguintes ensaios de laboratório para estudar o efeito do pH e das excreções radiculares de *P. notatum* no desenvolvimento de *A. paspali*:

a) estudo comparativo entre o meio de cultura feito com exsudato radicular de *P. notatum* e o feito com água em diversos níveis de pH;

b) estudo do efeito de diversas concentrações de exsudato radicular em dois níveis de pH.

O exsudato radicular de *P. notatum* foi obtido do seguinte modo: colhidas e lavadas as mudas, mergulhamos a sua parte radicular em água destilada e as deixamos expostas a condições naturais por vários dias, filtramos, diluímos ou concentramos em estufa a 70°C. Fizemos o meio de cultura seguinte:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,125 g
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	0,025 g
NaMoO_4	0,005 g
CaCl_2	0,200 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025 g
Sacarose	5,000 g
Água ou exsudato	1 000,000 ml

Os diferentes tampões para êste meio foram obtidos através de relações crescentes entre $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ de modo a se obter a concentração final de 0,067 molar. Fizemos as seguintes concentrações:

Meio de cultura	KH_2PO_4 0,67 M	Na_2HPO_4 0,67 M	pH
90 ml	9,9 ml	0,1 ml	4,7
"	9,8 ml	0,2 ml	5,2
"	9,5 ml	0,5 ml	5,5
"	9,0 ml	1,0 ml	5,9
"	8,0 ml	2,0 ml	6,1
"	7,5 ml	2,5 ml	6,3
"	7,0 ml	3,0 ml	6,5
"	6,0 ml	4,0 ml	6,7
"	5,0 ml	5,0 ml	6,9
"	4,0 ml	6,0 ml	7,0
"	3,0 ml	7,0 ml	7,1
"	2,5 ml	7,5 ml	7,2
"	1,0 ml	9,0 ml	7,4
"	0,5 ml	9,5 ml	7,6

O pH final variou, no máximo, 0,3 unidades do inicial mostrando eficiência satisfatória dos tampões.

O desenvolvimento da bactéria foi avaliado pela densidade ótica medida num colorímetro Klett Summerson com filtro n.º 54 (520 – 560 μ), ajustando-se o aparelho com o meio de cultura estéril de cada tratamento. O pigmento foi avaliado pela diferença entre as medidas com filtro n.º 54 e as com filtro n.º 42 (400 – 450 μ).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores, Döbereiner (1966) verificou que *Azotobacter paspali* só ocorre em solos sob vegetação de *Paspalum notatum* e *P. plicatum* sendo também esta ocorrência mais abundante nos solos do rizoplan que nos da rizosfera. Neste mesmo trabalho, Döbereiner assinala ainda que não se verifica a ocorrência de *A. paspali* nos solos da rizosfera de *Cynodon dactylon* e *Hyparrhenia rufa* (dados não publicados) quando as amostras destas gramíneas foram colhidas em locais onde não se achavam associadas ao *P. notatum*. Os dados apresentados no Quadro 1, relativos à ocorrência de *A. paspali* na rizosfera e rizoplan de *C. dactylon* e *H. rufa* com amostras colhidas em locais em que se achavam associadas ao *P. notatum*, mostram mais uma vez a influência específica do *Paspalum* no desenvolvimento de *A. paspali* uma vez que número maior de microcolônias foi encontrado na rizosfera. Sabemos perfeitamente que na associação destas gramíneas, no rizoplan do *C. dactylon* e *H. rufa*, foi menor o efeito do *Paspalum notatum* que no solo da rizosfera, razão do maior número de microcolônias de *A. paspali* encontrado no último.

QUADRO 1. Efeito de gramíneas outras que não *Paspalum* na ocorrência de *Azotobacter paspali* e no pH (médias de 14 amostras)

	N.º de microcolônias/g de solo	pH
Rizosfera	2 980	5,36
Rizoplan	970	5,23
Valores de F	19,17**	n.s.

* *Cynodon dactylon* e *Hyparrhenia rufa*, colhidos em campos nos quais a vegetação dominante é *Paspalum notatum*.

Em relação ao pH, notamos que entre o medido na rizosfera e o medido no rizoplan do *C. dactylon* e *H. rufa* não há diferença estatística, embora o do rizoplan seja um pouco mais baixo. Nos Quadros 2 e 5 podemos verificar justamente o oposto nos vasos com *P. notatum*, isto é, um aumento do pH do solo nos vasos plantados com esta gramínea.

No experimento de vasos, tentou-se elucidar dificuldades encontradas em experimentos anteriores no

sentido da sobrevivência de *A. paspali* em casa-de-vegetação, principalmente em areia (Peixoto & Döbereiner 1966).

Nos Quadros 2, 3 e 4 notamos diferenças altamente significativas entre solo e areia nas contagens de microcolônias da rizosfera, confirmando, pois, as dificuldades encontradas pelo *A. paspali* na sobrevivência em areia. É pouco provável que a causa seja uma deficiência mineral, uma vez que usamos em todos os tratamentos doses uniformes de P, K, elementos menores e uma dose reduzida de nitrogênio. Do mesmo modo, é pouco provável também que o pH seja responsável, pois este, medido nos vasos com areia, foi o mais apropriado para o desenvolvimento de *A. paspali*, como será visto adiante nos ensaios com meio de cultura.

Azotobacter paspali se desenvolveu melhor nos vasos com solo e calcário, mesmo nos tratamentos sem plantio, durante todo o experimento (6 meses). Possivelmente, este melhor desenvolvimento se deu devido a substâncias existentes neste solo que foi colhido sob vegetação de *P. notatum* e, também, a um pH apropriado. Já no solo sem calagem e sem planta, onde o pH variou entre 5,1 e 5,4 o número de microcolônias de *A. paspali* foi diminuindo sensivelmente com o tempo, como pode ser visto na Fig. 1.

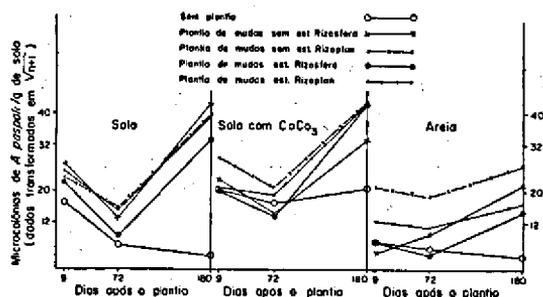


FIG. 1. Sobrevivência de *Azotobacter paspali* em vasos com os diversos tratamentos.

As diferenças no número de microcolônias de *A. paspali* entre a rizosfera dos tratamentos com solo e a dos tratamentos com areia foram grandes como já assinalamos; entretanto estas diferenças foram menores no rizoplan dos referidos tratamentos, demonstrando que a planta pode compensar efeitos prejudiciais da areia. Na Fig. 1 podemos observar efeitos mais pronunciados da planta no desenvolvimento de *A. paspali* nos tratamentos feitos em areia, tendo sido responsável por estes efeitos, principalmente, os tratamentos com inoculação e os com plantio de mudas (Quadro 2).

O efeito da inoculação se notou principalmente na segunda época, pois duas das quatro repetições na

QUADRO 2. Efeito dos tratamentos e do pH do solo na sobrevivência de *Azotobacter paspali* *

Tratamento	Mudas de <i>P. notatum</i>	Inoculação	1.ª contagem			2.ª contagem			3.ª contagem		
			pH final	Rizosfera	Rizoplan	pH final	Rizosfera	Rizoplan	pH final	Rizosfera	Rizoplan
Solo	Sem mudas	+	5,1	15,2	—	5,0	6,5	—	5,3	3,0	—
	Esterilizados	+	5,1	20,7	23,7	5,6	9,7	18,0	5,5	27,2	34,9
	Sem esterilização	+	5,4	23,5	18,4	5,3	16,8	15,4	5,6	43,3	46,3
	Sem mudas	—	5,1	20,3	—	5,0	6,2	—	5,4	4,1	—
	Esterilizados	—	5,0	19,8	26,3	5,2	7,6	12,3	5,5	39,2	40,2
	Sem esterilização	—	5,2	28,0	29,5	5,3	9,8	16,7	5,5	35,9	33,0
Solo com Ca CO ₃	Sem mudas	+	5,5	24,4	—	5,7	18,9	—	5,9	21,5	—
	Esterilizados	+	5,8	23,2	25,8	5,8	17,6	19,4	5,9	47,3	34,8
	Sem esterilização	+	5,8	21,9	28,1	5,8	12,5	27,6	5,9	41,6	49,2
	Sem mudas	—	5,8	16,3	—	5,7	15,5	—	5,8	20,1	—
	Esterilizados	—	5,8	26,9	15,3	5,7	13,5	14,8	5,8	37,4	49,7
	Sem esterilização	—	5,8	24,4	29,1	5,8	15,9	14,9	5,9	25,8	37,2
Areia	Sem mudas	+	6,2	12,2	—	6,3	10,5	—	6,7	5,4	—
	Esterilizados	+	6,3	14,3	11,3	6,5	8,5	20,1	6,8	21,8	25,0
	Sem esterilização	+	6,3	7,3	20,6	6,4	11,1	24,2	6,7	18,7	25,7
	Sem mudas	—	6,1	2,7	—	6,5	1,0	—	6,5	2,3	—
	Esterilizados	—	6,3	1,0	13,3	6,5	1,0	1,5	6,6	7,2	9,4
	Sem esterilização	—	6,4	1,0	21,8	6,4	6,1	13,2	6,7	25,4	27,4

* Resultados médios de 4 repetições em microcolônias/g de solo transformados em $\sqrt{n+1}$.

QUADRO 3. Análise conjunta do número de microcolônias de *A. paspali* na rizosfera e no rizoplan (totais dos tratamentos correspondentes)

Tratamentos em	Rizosfera	Rizoplan	Inoculada	Sem Inoculação	Mudas Esterilizadas	Mudas sem Esterilização	Total
Solo	11.442	12.596	12.125	11.013	11.190	12.848	24.038
Solo e Ca CO ₃	12.165	13.839	13.805	12.199	12.875	13.129	26.004
Areia	4.940	8.548	8.354	5.134	5.384	8.104	13.483
Totais	28.547	34.983	34.284	29.246	29.449	34.081	63.530

QUADRO 4. Análise de variância dos dados relativos às contagens de *Azotobacter paspali* apresentados nos Quadros 2 e 3 (valores de F)

Fonte de variação	1.ª contagem		2.ª contagem		3.ª contagem		Conjunta*
	Rizosfera	Rizoplan	Rizosfera	Rizoplan	Rizosfera	Rizoplan	
Solos	22,70**	2,77	12,28**	—	9,47**	9,29**	31,85**
Plantio	—	2,80	1,50	1,90	16,59**	—	5,03*
Inoculação	—	—	6,15**	7,50**	1,44	—	5,95*
Solo × plantio	2,90*	—	—	—	—	—	—
Épocas	—	—	—	—	—	—	63,22**
Rizosfera × Rizoplan	—	—	—	—	—	—	9,71**
Época × Solo	—	—	—	—	—	—	4,19**

A análise conjunta incluiu as 3 épocas dos dados de rizoplan e rizosfera, eliminando-se os tratamentos sem plantio.

QUADRO 5. Análise de variância dos dados relativos ao pH apresentados no Quadro 2 (Valores de F)

Fontes de variação	1.ª contagem	2.ª contagem	3.ª contagem
Solos	281,53***	229,83***	293,12***
Plantio	5,19**	6,50**	3,35**
Inoculação	—	—	—

primeira contagem foram feitas antes da inoculação. Já na última contagem, o efeito não foi notado.

Uma das explicações do efeito favorável de *Paspalum notatum* sobre o desenvolvimento de *A. paspali* seria que esse efeito poderia ser atribuído a uma tamponização do pH. Em trabalhos anteriores (Döbereiner 1966), foi assinalada a presença de *A. paspali* em solos com pH 4,9. No entanto, em meio de cultura a bactéria só se desenvolveu em pH superior a 6,4 (Fig. 3). Os resultados apresentados nos Quadros 2 e 5 mostram um aumento significativo do pH nos vasos com planta, nas 3 épocas, principalmente nos vasos de solo sem calcário. Como os dados do presente experimento não permitem que se faça uma diferenciação entre aumento de pH e fornecimento do elemento cálcio, este último poderia ser o responsável pelo maior desenvolvimento de *A. paspali*. Neste caso, as excreções das raízes de *P. notatum*, que influíram grandemente no crescimento de *Azotobacter paspali* em meio de cultura, forneceriam cálcio (Fig. 2 e 3).

Para estudar detalhadamente o efeito do pH e das excreções radiculares de *P. notatum* fizemos inicialmente um experimento em condições de laboratório que abrangesse uma faixa maior de pH. Seu resultado pode ser visto na Fig. 2, onde se verifica desenvolvimento de *A. paspali* apenas nos frascos com pH 6,8 e 6,9. Na repetição do mesmo experimento numa menor faixa de pH se pode verificar (Fig. 3) bom desenvolvimento de pH 6,7 a 7,0. Esta faixa extremamente estreita de tolerância ao pH do meio está em desacordo com trabalhos anteriores onde se tinha observado uma certa tolerância até o pH 5,8 e 8,4, tendo-se, no entanto, também neste trabalho, o maior desenvolvimento em pH 6,6 a 6,8 (Döbereiner 1966). A tolerância a uma maior faixa de pH na-



FIG. 2. Efeito do pH e do exsudato radicular de *Paspalum notatum* no desenvolvimento de *Azotobacter paspali*. Frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 30 ml de meio, inoculados com alça de platina e incubados durante 5 dias em temperatura ambiente no agitador mecânico (142 rpm). Meio de cultura tamponado com diferentes relações de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,067 M. Densidade ótica medida num colorímetro Klett-Summerson com filtro n.º 54 (520-540)

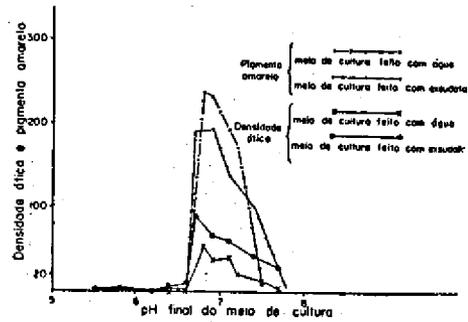


FIG. 3. Efeito do pH e do exsudato radicular de *P. notatum* no desenvolvimento de *A. paspali*. Densidade ótica medida num colorímetro Klett-Summerson com filtros n.º 54 (520-540) e 42 (400-450). A pigmentação foi obtida pela diferença entre as leituras feitas com os dois filtros. Frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 30 ml de meio, tamponados com relações crescentes de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,067 M, inoculados com alça de platina e incubados durante 7 dias em temperatura ambiente no agitador mecânico (142 rpm). Dados médios de 2 estirpes.

quele trabalho possivelmente se deve à maior quantidade de inóculo, pois lá foi usado 1 ml de *A. paspali* para inoculação, enquanto no presente trabalho usamos apenas uma alça de platina.

Observações interessantes resultaram da medida da densidade ótica com 2 filtros diferentes (colorímetro Klett-Summerson com filtros número 54 (520-540) e 42 (400-450). Admitindo-se que o filtro verde absorve um mínimo da pigmentação amarela característica daquelas culturas e o roxo o máximo, podemos concluir que a diferença entre as medidas com os dois filtros nos dá uma avaliação da intensidade da formação do pigmento. Na Fig. 3, pode-se observar que a formação do pigmento amarelo acompanha o desenvolvimento de *A. paspali*; a adição de exuda-

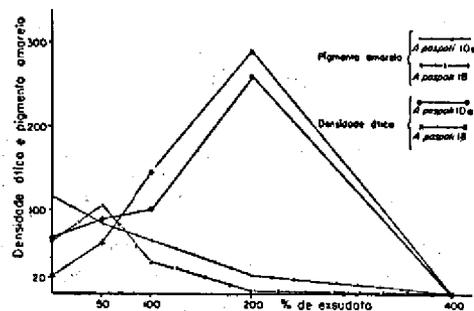


FIG. 4. Efeito de diversas concentrações de exsudato radicular de *P. notatum* no desenvolvimento de *A. paspali* com pH 6,6. Frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 30 ml de meio, tamponados com relações crescentes de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,067 M, inoculados com alça de platina e incubados durante 5 dias em temperatura ambiente no agitador mecânico (142 rpm). Densidade ótica medida num colorímetro Klett-Summerson com filtros n.º 54 (520-540) e 42 (400-450). A intensidade de pigmentação foi obtida pelas diferenças entre as leituras feitas com os 2 filtros.

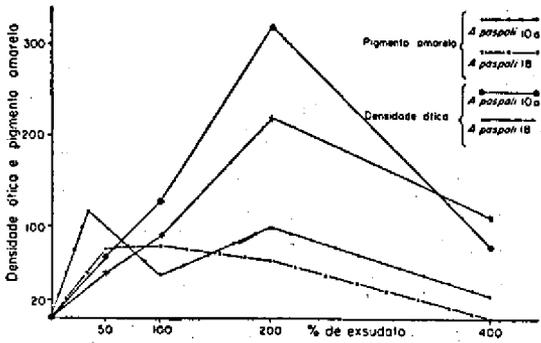


FIG. 5. Efeito de diversas concentrações de exsudato radicular de *Paspalum notatum* no desenvolvimento de *A. paspali* em pH 6,8 (detalhes do método empregado na Fig. 4).

to, no entanto, apesar de aumentar o desenvolvimento, reduziu a formação do pigmento.

O efeito do exsudato das raízes foi estudado mais detalhadamente nos ensaios apresentados pela Fig. 4 e 5. Tanto com pH 6,6 como com pH 6,8 melhor desenvolvimento se observou quando o meio de cultura foi preparado com exsudato concentrado duas vezes. Com o pH mais elevado, até com uma concentração de quatro vezes, o exsudato permitiu desenvolvimento razoável, o mesmo não acontecendo com pH 6,6, quando nesta concentração o desenvolvimento foi nulo. Com baixas concentrações de exsudato e principalmente nos frascos sem o mesmo, observou-se o contrário: com pH 6,6 houve desenvolvimento enquanto que com 6,8 não houve. Como já foi observado anteriormente, o aumento da concentração de exsudato diminuiu a formação de pigmento.

O efeito favorável do exsudato, no desenvolvimento de *A. paspali*, pode ser a confirmação do encon-

trado no experimento de vasos, isto é, os vasos sem plantio de *Paspalum notatum* tiveram nos tratamentos de solo, solo com calcário, e areia, menor número de microcolônias de *A. paspali* que os com plantio. Provavelmente, a concentração de 200% de exsudato é próxima da encontrada em condições normais no solo próximo às raízes.

Nada podemos concluir sobre a natureza da substância ativa no exsudato, uma vez que nenhuma análise foi feita; sabemos, no entanto, que ela resiste ao calor da esterilização (30 minutos em 120°C), o que exclui a possibilidade de serem enzimas ou vitaminas sensíveis ao calor.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner, J. & Ruschel, A. P. 1962. Inoculação do arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* Derx. Rvta bras. Biol. 21:397-407.
- Döbereiner, J. 1959. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. Rvta bras. Biol. 19:401-412.
- Döbereiner, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Pesq. agropec. bras. 1:357-365.
- Macura, J. 1966. Interactions nutritionnelles plants-bacteries et bases experimentales de la bacterisation des graines. Rapport général. Ann. Inst. Pasteur 111 (Suppl. n.º 3):9-38.
- Pantos, G. 1956. Qualités physiologiques des bacteries dominantes das la rhizosphère du blé pendant les différents périodes de développement de la plante et leur effect sur la plante. VI Congr. int. Sci. Sols, Paris, C, p. 237-241.
- Peixoto, G.S.S. & Döbereiner, J. 1966. (Dados não publicados)
- Rovira, A.D. 1962. Plant-root exudates in relation to the rhizosphere microflora. Soils Fertil. 15:167-172.
- Rovira, A.D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganism, p. 170-186. In Baker, K.F. & Snyder, W.C. (ed.), Ecology of soil born plant pathogens. Univ. California Press.
- Ruschel, A.P. & Britto, D.P.P. de S. 1966. Fixação simbiótica de nitrogênio em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. Pesq. agropec. bras. 1:65-69.

FURTHER STUDIES ON THE PHYSIOLOGY OF *Azotobacter paspali* AND ITS DEPENDENCE ON THE PLANT (*Paspalum notatum*)

Abstract

A number of experiments were carried out to explain the specific stimulating effect of *Paspalum notatum* on *Azotobacter paspali* growth.

Natural occurrence of *A. paspali* was studied in the rhizosphere of *Cynodon dactylon* and *Hyparrhenia rufa* growing in consociation with *Paspalum notatum*. A decrease of these bacteria was observed in the rootsurface soil of those grasses when compared with rhizosphere soil, confirming the specific effect on these bacteria of *P. notatum*.

In a greenhouse experiment, survival of *A. paspali* was studied in pots with soil collected under *Paspalum* swards with and without liming and in pots with sand. Soil collected under *Paspalum* was less injurious than sand although the pH of the soil was lower. Liming the soil still improved conditions for *A. paspali* growth. When *Paspalum notatum* was planted in the pots, bacteria survival was satisfactory, sterilized plants poorer than natural ones and inoculated seedlings better than uninoculated ones. Rhizoplan samples contained higher numbers of the organisms than rhizosphere soil. All these differences became more pronounced in sand.

In laboratory experiments the effect of root exudate of *P. notatum* and pH levels were studied in liquid culture medium. Good growth of *A. paspali* was observed to be dependent on maintaining a quite narrow pH range (6.7 to 7.0). Increasing amounts of root exudate stimulated growth of this organism up to 200% of the original solution. The active substances were resistant to autoclaving at 120°C for 30 minutes thereby excluding the possibility that they are natural enzymes. Production of a yellow pigment was reduced by the root exudate.