

MINISTRO DA AGRICULTURA

Dr. João Cleofas, Eng.º Civil

DIRETOR DO CENTRO NACIONAL DE ENSINO E PESQUISAS
AGRONÔMICAS

Dr. Waldemar Raythe de Queiroz e Silva, Eng.º Agr.º

DIRETOR DO SERVIÇO NACIONAL DE PESQUISAS AGRONÔMICAS

Dr. Felisberto C. Camargo, Eng.º Agr.º

DIRETOR DO INSTITUTO DE ECOLOGIA E EXPERIMENTAÇÃO
AGRICOLAS

Dr. Heitor Airlie Tavares, Eng.º Agr.º

Azotobacter em Solos Ácidos

Johanna Döbereiner

COMISSÃO DE PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS TÉCNICOS

Cesar Augusto Lourenço

Okiro de Senna Braga

Abeilard Fernando de Castro

RIO DE JANEIRO

1953

AZOTOBACTER EM SOLOS ÁCIDOS

Johanna Döbereiner

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

- I. Introdução
- II. *Azotobacter* no solo
 - 1. Métodos
 - 2. Resultados
 - 3. Primeira conclusão
- III. *Azotobacter* em meios de cultura ácidos
 - 1. Meios acidificados com H_2SO_4 e outros com HCl
 - 2. Meios constituídos de solos ácidos
 - 3. Segunda conclusão
- IV. Assimilação de nitrogênio do ar
- V. Sumário
- VI. Zusammenfassung
- VII. Summary
- VIII. Literatura citada

I -- INTRODUÇÃO

O nitrogênio é uma das substâncias nutritivas mais importantes para as plantas. Ainda que o encontremos na atmosfera em quantidades ilimitadas, todos os solos cultivados necessitam de nitrogênio. Este pode ser fixado por processos químicos e adicionado ao solo como adubo mineral, mas o preço destes produtos, em relação à produção obtida na agricultura extensiva, ainda é muito alto. Seria mais econômico aproveitar os processos biológicos no solo para cobrir, ao menos parcialmente, a necessidade de nitrogênio.

Há muito tempo que a agronomia mundial se ocupa deste problema. Em nossos solos, cultivados mais ou menos extensivamente, a necessidade de nitrogênio é muito menor que nas fazendas de cultura intensiva da Europa e doses relativamente pequenas de N já têm grande valor.

Entre os microorganismos fixadores desse elemento temos que citar em primeiro lugar as bactérias das leguminosas, que, vivendo em simbiose com a planta, podem sustentá-la completamente com nitrogênio fixado da atmosfera. Desta maneira, com uma adubação verde ou com uma plantação de leguminosas o solo pode se enriquecer em nitrogênio.

Com menos intensidade que as bactérias simbióticas, podemos considerar as não simbióticas, quer dizer livres e que, também, podem fixar no solo nitrogênio do ar. Incluímos neste grupo de bactérias, aquelas que vivem livremente no solo e se alimentam de substância orgânica. Estas têm a capacidade de assimilar o nitrogênio elementar da atmosfera e de construir pelo amoníaco as albuminas da sua célula, quando não encontram suficiente N no solo (8).

As bactérias mais importantes dêste grupo são as seguintes (1):

I) Anaeróbias

Bacillus amylobacter Bredemann (syn. *Clostridium pasteurianum* Winogradsky).

II) Aeróbias

a) *Azotobacter*

1) *Azotobacter chroococcum* Beijerinck

2) *Azotobacter vinelandii* Lipman

3) *Azotobacter beijerinckii* Lipman

4) *Azotobacter agilis* Beijerinck

5) *Azotobacter indicum* Starkey

b) *Azotomonas insolata* (9) Stapp

c) *Bacillus asterosporus* (A. Meyar) Migula

Nesta relação foram mencionados microorganismos fixadores de nitrogênio do ar, mas cuja importância para o enriquecimento do solo, com nitrogênio, não deve ser grande.

As bactérias mais comuns dêste grupo são o anaeróbio *Bacillus amylobacter* e o aeróbio *Azotobacter*. O primeiro é espalhado por todo o mundo e por causa das suas pequenas exigências, especialmente no caso da concentração dos H-Ionos, encontra-se em quase todos os solos até pH 5 -5,2 (2).

Bacillus amylobacter encontramos em tôdas as amostras examinadas. Êste bacilo é fácil de se reconhecer pela sua produção de gás e pelo cheiro característico de ácido butírico em meios de cultura líquidos, sem nitrogênio combinado, e com açúcares. O exame microscópico mostra bastonetes grandes, típicos.

Azotobacter, ao contrário, é ligado a condições aeróbias e prefere solos neutros até alcalinos. Temos que diferenciar cinco espécies de *Azotobacter*:

Azotobacter chroococcum Beijerinck é o mais conhecido e o mais comum. Em meio de cultura sem nitrogênio, contendo manitol e fosfato de potássio, inoculado com solo, o *Azotobacter chroococcum* Beijerinck forma uma película, no início branca, mais tarde castanha (2). Ao microscópio observamos grandes células móveis, em pares, com um flagelo polar, do tamanho de 3-4 por 5-6 micra. Culturas mais velhas mostram micrococos de tamanhos diferentes, com paredes escuras até pretas. As novas, como também as células velhas, são circundadas por massas mucilaginosas (Fig. 1). A formação de esporos foi observada por uns autores e negada por outros (2). Este organismo pode fermentar diferentes carboidratos, especialmente os mono- e di-sacarídeos transformando-os em $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. A celulose não pode ser decomposta. A quantidade da fonte energética determina o volume de N_2 assimilado. Em condições ótimas, o *azotobacter* pode fixar com 1 g de carboidrato até 16-17 mg de nitrogênio (1).

O *Azotobacter vinelandii* Lipman, no mesmo meio de cultura, mostra uma película grossa e branca e perto da superfície um pigmento amarelo que se difunde para baixo no líquido. A célula mede 2,5 por 1,2 micra e é móvel, em culturas recentes.

Azotobacter beijerinckii Lipman forma uma película branca na superfície do mesmo meio, no qual provoca uma turvação. Em meio sólido produz pigmentos amarelos.

A célula é maior do que *Azotobacter chroococcum* Beijerinck e imóvel.

Azotobacter agilis Beijerinck. Isolado da água distingue-se das outras do mesmo gênero pela sua intensa mobilidade e por produzir um pigmento vermelho ou verde em meios contendo sais de alguns ácidos orgânicos.

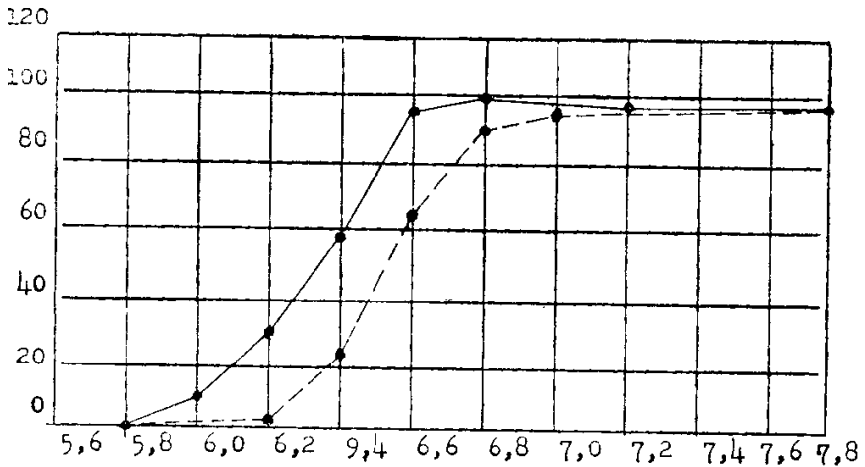
Azotobacter indicum Starkey. Descoberto em 1939 por STARKEY (10) nos solos tropicais de Malaia resiste a uma acidez do solo até pH 4,5. Em placas de "sílica-gel" inoculadas

com terra, o organismo, somente, se desenvolve na temperatura de 30°C após uma incubação de 15 dias. O germe é menor, apenas com 0,5-1,2 por 1,7-2,7 *micra*. Cada célula contém duas bolas de gordura, uma em cada lado.

Segundo todas as indicações da literatura, as espécies de *azotobacter*, com exceção de *Azotobacter indicum* Starkey, não só preferem solos neutros, como não podem existir em solos com pH baixo de 6. RIPPÉL (1) demonstra com o gráfico de CHRISTENSEN, que nenhum solo com pH abaixo de 5,8 contém *azotobacter*.

O gráfico de CHRISTENSEN:

Percentagens de solos que continham *azotobacter*.



Azotobacter muito desenvolvido - - - - -

Azotobacter mal desenvolvido _____

WAKSMAN menciona que pH 5,6 — 6 é a maior acidez que ainda permite o crescimento do *azotobacter*. Para êle, a causa da ausência de *azotobacter* em diferentes solos é a reação ácida. Para TCHAN e POCHON (3) o mínimo do crescimento do *azotobacter* pode ser observado no meio de pH 5,8. Segundo VERONA (4) ainda, em solos com pH 5,5 encontra-se uma fixação de nitrogênio.

<i>pH da terra</i>	<i>N fixado</i>
5	—
5,5	0,0176 g
6	0,0754 g
6,5	0,0765 g
7	0,0841 g
7,5	0,0918 g

WINOGRADSKY⁽⁶⁾ examinou numerosos solos de diferentes países para determinar o seu poder de fixação do nitrogênio e, já, em solos com pH 6,6 observou poucas colônias de *azotobacter* e uma fixação de N quase nula. Em solos de Creta com pH 5,8 só apareceram colônias de cocobacilos que não mais apresentam fixação de N.

Ao contrário disso, ALTSON⁽¹¹⁾, STARKEY⁽¹⁰⁾ e JENSEN⁽¹²⁾ referem-se a espécies de *azotobacter* isoladas de solos ácidos da Malaia, em condições tropicais parecidas com as nossas. STARKEY isolou tribos de *Azotobacter chroococcum* BELJERINCK e *Azotobacter indicum* STARKEY d'êstes solos cujos ppHH estiveram entre 4,5 e 5,3. Partindo de 1 g de manitol o mesmo autor notou a seguinte fixação de nitrogênio:

<i>Azotobacter indicum</i> Starkey	6 mg
<i>Azotobacter vinelandii</i> Lipman	11 mg
<i>Azotobacter chroococcum</i> Beijerinck.....	9 mg

ALTSON isolou *azotobacter* dum solo orgânico aluvial com pH 4,6. Estas tribos se mostraram calcifobas e o autor conseguiu cultivá-las em placas de sílica-gel:

<i>Placas de sílica-gel de Winogradsky</i>	<i>pH</i>	<i>Número das colônias (médias de 2 placas)</i>
mais 2,5 % CaCO ₃	6,0	11,5
mais 0,075 % CaCl ₂ ...	4,8	28,5
sem Ca.....	4,8	28,0

Dadas as condições climáticas do Brasil poderemos esperar que o comportamento de *azotobacter* em nossos solos, difira dos da Europa ou América do Norte. As exigências do *azotobacter* em temperatura são relativamente altas; o ótimo de fixação do nitrogênio dado por RIPPEL (1) é 25° — 30°C. As temperaturas tropicais quase conferem com este ótimo. Pode admitir-se que a microflora do solo desta zona se acomodou às condições de solos mais pobres e ácidos, mas com temperaturas ótimas. A possibilidade desta acomodação mostra a indicação de RIPPEL (1) de que a célula de *azotobacter* dos solos tropicais tem o seu ótimo de crescimento numa temperatura de 35°C, enquanto que nos solos das zonas temperadas é de 28°C.

Também, em nosso meio, como mostramos nos ensaios abaixo citados, verificámos em quase todos os solos examinados — solos ácidos como também em solos alcalinos — a presença de *azotobacter*. Isolamos diferentes tribos e continuámos sua cultura (Tabela I).

II — AZOTOBACTER NO SOLO

Os trabalhos fôram realizados no laboratório de Microbiologia do Solo da Seção de Fertilidade do Solo, da qual é o Chefe o Dr. Waldemar Mendes.

I — Métodos

Primeiro usámos a conhecida técnica indicada por FRED e WAKSMAN (7); 20 ml do meio 77 dos mesmos autores (7) em frascos de ERLLENMEYER de 100 ml fôram esterilizados, inoculados com 1 — 2 g de terra e incubados a 30°C. Quase sempre, depois de 24 horas, era possível observar a atividade de *Bacillus amylobacter* pelas bolas de gás. No fim de 3 dias o líquido, nos frascos, estava coberto, uns mais outros menos, de espuma, produzida pelas bolhas de gás de *Bacillus amylobacter* e pela massa mucosa do *azotobacter* (Fig. 5). Depois de 8 dias a produção de gás parou e se formou uma película que se tornava lentamente castanho es-

cura. O exame microscópico nos mostrou a presença mais ou menos abundante de células típicas, em pares, de *azotobacter*.

Inoculamos os mesmos solos em placas de sílica-gel preparados pelo método de WINOGRADSKY (6): Solução de silicato de sódio (densidade 1,06) e ácido clorídrico (densidade 1,10) foram misturados em partes iguais e passados a placas de PETRI de diâmetro 9,5 cm, sendo colocados 30 ml em cada uma. Depois de 24 horas as placas eram lavadas, primeiro 48 horas em água corrente e mais duas vezes em água destilada e uma última vez em água destilada fervendo. As placas assim limpas de todos os cloretos foram impregnadas com o seguinte meio:

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	traços
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	traços
Manitol	40 g
H_2O	200 ml

Dêste meio foram colocados 2 ml, misturados com 0,3 g $CaCO_3$, em tubos de ensaio; para cada placa um tubo. Os tubos, assim preparados, foram aquecidos até à fervura e o líquido passado, ainda fervendo, às placas. Estas foram levadas a estufa de 55°C e secadas até o desaparecimento do líquido. As placas dessecadas foram colocadas nas tampas, que continham papel de filtro. A inoculação foi feita diretamente com terra. Com um tubo de vidro capilar recentemente preparado e molhado punha-se 100 partículas pequenas do solo em cada placa. A incubação foi a 30°C (fig. 6).

Tivemos diversas dificuldades porque, nem todos os solos, nos quais determinamos o *azotobacter* pelo método de FRED e WAKSMAN, formavam colônias nas placas de sílica-gel. Solos muito ricos em *azotobacter*, já causam um desenvolvimento de *azotobacter*, depois de 3 dias, em quase tôdas as partículas disseminadas, ao passo que solos mais pobres em *azotobacter*

mostravam um crescimento muito desigual. ALSTON (11) tinha dificuldades parecidas, quando colônias de *azotobacter*, em placas inoculadas com o mesmo solo, se desenvolveram diferentemente, tanto em tempo como em intensidade. Em uma das placas o crescimento se iniciou no 4.º dia, em outras no 8.º ou 14.º e em outras nem houve crescimento. Provavelmente, a causa desta irregularidade, tem sua origem na concorrência dos outros microorganismos, porque nessas placas, em lugar de colônias de *azotobacter*, apareceram pequenas colônias de outros microorganismos, como bactérias e fungos.

Daquelas placas isolamos algumas tribos de *azotobacter* que identificámos, sem dúvida, como *Azotobacter chroococcum* Beijerinck, com pigmento castanho escuro. Ao microscópio observamos as células típicas grandes, medindo 4-5 *micra* e em pares, circundadas com massas mucilaginosas, como se pode verificar bem na preparação negativa com nankim (Fig. 2). Assim, não se trata de *Azotobacter indicum* STARKEY encontrado por STARKEY em solos ácidos da Malaia, que se caracteriza por um crescimento muito lento. Outrosim, não achamos a propriedade calcífoba de *azotobacter* e que fôra determinada por ALSTON e STARKEY.

Examinámos pelos métodos descritos, 27 amostras de solos colhidos na área do Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas no km 47, no Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. As terras fazem parte da Baixada de Sepetiba, uma das subdivisões da Baixada Fluminense. A altitude varia entre 15 e 78 metros sôbre o nível do mar. Geològicamente esta região se manifesta, principalmente, através de formações do arqueano e do quaternário (14).

DESCRIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

N.º DA AMOSTRA	SOLO	ÁREA DA COLETA	pH	LOCAL DA COLETA
1	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	4,85	Jardim
2	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,75	Jardim adubado
3	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	4,90	Área capinada
4	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,00	Morro do Cruzeiro
5	Série Ecologia	Parque da S.E.P.	6,65	Jardim adubado
6	Série Ecologia	Setor Oleaginosas	5,60	Coqueiral com leguminosas
7	Série Ecologia	Setor Oleaginosas	6,05	Coqueiral capinado
8	Série Ecologia	Horta Industrial	7,20	Tomatal
9	Série Ecologia	Horta Industrial	6,80	Parcela adubada
10	Série Ecologia	Parque da S.E.P.	6,05	Gramado
11	Série Ecologia	Secção Botânica	5,35	Eucaliptal
12	Série Ecologia	Secção Botânica	4,90	Bosque de Esterculiáceas
13	Série Ecologia	Secção de Plantas Têxteis ..	5,05	Sisal e leguminosas
14	Série Ecologia	Secção de Plantas Têxteis ..	5,38	Área não capinada s/cultura

(Continua)

(Conclusão)

DESCRIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

N.º DA AMOSTRA	SOLO	ÁREA DA COLETA	pH	LOCAL DA COLETA
15	Série Ecologia	Secção Botânica	4,82	Bosque de diversas espécies
16	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,88	Gramado
17	Série Itaguaí	Secção Botânica	6,20	Laranjal
18	Série Itaguaí	Secção Botânica	6,18	Milharal
19	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,28	Bosque de leguminosas
20	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,62	Gramado
21	Série Itaguaí	Silvicultura	5,52	Eucaliptal
22	Série Itaguaí	Pomar da E.N. A.	4,62	Elevação
23	Série Itaguaí	Pomar da E.N. A.	5,38	Baixada
24	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	6,15	Jardim
25	Série Itaguaí	Parque da S.E.P.	5,64	Bosque de diversas espécies sub-espontâneas
26	Série Itaguaí	Alojamento de alunos da U.R.	5,34	Sub-solo exposto
27	Série Ecologia	Sericicultura	6,38	Amoreiral

Descrição das Séries. (1)

Série Itaguaí: Compreende os solos situados nas cotas mais elevadas, como por exemplo a de 78,2 m, ocorrendo, também, em cotas de 29,0 m. A drenagem é boa. Esta série comporta dois tipos que são:

Tipo A — Variedade de castanho, ocorre em cotas elevadas (78,2 a 41,0 m), com teor de carbono de 1,1 a 1,6 %. A textura superficial poderá ser de areia terrosa (mais de 50 % de areia) ou de areia, contendo 68 a 69 % de quartzo. Espessura de 14 cm.

Tipo B — Variedades de pardo e cinzentos amarelados, em cotas de 45,0 a 29,0 m, contendo de 0,5 a 1,3 de carbono; com textura de areia terrosa (mais de 50 % de areia) a areia argilosa (mais de 25 % de argila).

Série Ecologia: Compreende os solos situados nas cotas de 33 a 18,3 m. A drenagem varia de boa à lenta. Esta série comporta dois tipos que são:

Tipo A — Variedade de cinzento claro e cinzento escuro, ocorrendo em cotas de 33,0 a 18,0 m, contendo carbono abaixo de 0,9 %. A textura superficial é de areia (mais de 75 % de areia), contendo 100 % de quartzo e espessura variável de 50 a 200 cm.

Tipo B — Variedade de cinzento escuro, ocorrendo em cotas baixas de 19,0 a 18,3 m. A textura superficial é de areia terrosa (mais de 50 % de areia) e o teor de carbono variando de 1,46 a 1,82 %.

(1) Levantamento agrológico do Município de Itaguaí — 1953 — Inédito.

2 — RESULTADOS

TABELA I

SOLOS	pH	meios com CaCO ₃				sem CaCO ₃	
		frascos		placas de stl. Gel		frascos	placas (n.º de colônias)
		macrosc.	microsc.	número de colônias	início do crescimento (depois de ... dias)		
1) adubado com estrume, argiloso	4,85	Película bem formada	+++	17	4 — 8	—	6
2) com adubo mineral argiloso	5,75	espuma grossa	++	51	4	—	20
3) sem adubo argiloso	4,90	bolhas fracas	—	—	—	—	—
4) capoeira, argiloso	5,00	ligeira espuma	+	8	8 — 12	—	2
5) com adubo mineral, areia	6,65	película bem formada	+++	50	3	—	21
6) coqueiral com leguminosas, areia	5,60	espuma fraca	—	6	8 — 12	—	—
7) coqueiral, capinada, areia	6,05	película	++	75	2	—	—
8) horta, areia	7,20	fortíssima película	++++	92	2	—	48
9) horta, areia	6,80	película bem formada	+++	2	—	—	32
10) em baixo dum ficus, areia argilosa	6,05	película fraca	+	—	—	—	—
11) bosque de eucaliptos, areia	5,35	não tem película	—	—	—	—	—
12) bosque de esterculiáceas, areia	4,90	espuma fraca	.	—	—	—	—
13) campo plantado com leguminosas, areia	5,05	ligeira	+	—	—	—	—
14) campo de capim, areia	5,38	película	+	—	—	—	—
15) bosque de diversas espécies, areia	4,82	película bem formada	++	—	—	—	—
16) gramado, areia	5,88	não tem película	—	—	—	—	—
17) plantação de laranja, areia argilosa	6,20	grossa espuma	+	—	—	—	—
18) plantação de milho, areia argilosa	6,18	película bem formada	+++	2	8	—	—
19) arbusto de leguminosas, areia argilosa	5,28	película bem formada	++	76	2	—	—
20) gramado, areia argilosa	5,62	película	+	2	9	—	—
21) plantado com eucaliptos, areia	5,52	película bem formada	++	—	—	—	—
22) plantação de mangueiras, areia argilosa	4,62	película bem formada	+++	—	—	—	—
23) plantação de mangueiras, areia argilosa	5,38	película	+	—	—	—	—
24) plantação de pinheiros, areia argilosa	6,15	película bem formada	+++	10	4	—	—
25) mato, areia argilosa	6,64	película bem formada	++	—	—	—	—
26) terreno baldio, vermelho, areia argilosa	5,34	não tem película	—	—	—	—	—
27) capinado, areia	6,58	película bem formada	+++	—	—	—	—

Notas:

- + poucas células de *azotobacter*
- ++ a metade dos germens visíveis são *azotobacter*
- +++ *azotobacter* predominante
- ++++ parece uma cultura pura

Os números nas placas de sílica-gel indicam a média das colônias contadas em 10 placas (5 repetições) dos solos 1-9 ou em 2 placas dos solos 10-27.

O exame dos solos 1-8 foi repetido três vezes por método de frascos e cinco vezes por método de placas de sílica-gel.

3 — Primeira conclusão

O exame de 27 solos diferentes, colhidos na área do Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas, no Km 47, na Baixada Fluminense, permite concluir o seguinte:

- 1) O *Azotobacter chroococcum* Beijerinck esteve presente em 22 dos 27 solos.
- 2) Em todos os solos alcalinos e ligeiramente ácidos com pH acima de 6,35 encontramos *azotobacter* em grande abundância.
- 3) Ao contrário das indicações da literatura, o *azotobacter* se desenvolve em solos ácidos em pH abaixo de 5,80. Os solos mais ácidos, dos quais, ainda isolamos *azotobacter*, foram os solos n.º 22 com pH 4,62, n.º 15 com pH 4,82 e n.º 1 com pH 4,85.
- 4) O desenvolvimento do *azotobacter* parece não depender somente do pH do solo. Acontece que solos mais ácidos contêm mais *azotobacter* do que outros mais alcalinos, como por exemplo os solos n.º 1 e 22 comparados aos solos n.º 10 e 17.

III — AZOTOBACTER EM MEIOS DE CULTURA

Podia esperar-se que o comportamento de *azotobacter*, em meios de cultura ácido, seria diferente do seu comportamento no solo. Para observar o desenvolvimento do *azotobacter*, em meios ácidos de cultura, foram feitos diferentes experimentos.

1 — Meios acidificados com H_2SO_4 e outros com HCl

Preparamos o seguinte meio:

KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl	0,2 g
$FeSO_4$	traços
$MnSO_4$	traços
$CaCl_2$	0,02 g
Manitol	10,00 g
Agar-agar	25,00 g
Água destilada	1000,00 ml

O meio foi esterilizado em porções de 100 ml e depois adicionado N/10 H_2SO_4 .

H_2SO_4 para 1 ... neutralizado com NaOH.

Meio 2	sem H_2SO_4
Meio 3	1 ml H_2SO_4
Meio 4	3 ml H_2SO_4
Meio 5	5 ml H_2SO_4
Meio 6	7 ml H_2SO_4

O meio de cultura preparado dêste modo, foi passado às placas de PETRI esterilizadas e posto a resfriar. No dia seguinte, as placas foram inoculadas com duas tribos *azotobacter* e incubados a 30°C por 7 dias. As placas neutralizadas com NaOH mostraram um crescimento abundante, ao passo que nas mesmas sem H_2SO_4 e nestas do meio 3 o *azotobacter* se desenvolveu fracamente. Tôdas as demais placas ficaram sem crescimento algum.

Êste ensaio, foi repetido com menores quantidades de H_2SO_4 : neutralizado com NaOH — 0 — 1 — 1,5 — 2 — 2,5

— 3 ml N/10H₂SO₄. Uma série de placas foi inoculada com uma tribo de *azotobacter* e outra série com a cultura obtida nas placas do “meio 3” do ensaio anterior. Como no primeiro ensaio, os últimos traços de crescimento foram observados no meio 3, mesmo na placa inoculada com a tribo de *azotobacter* já passada do meio ácido.

Foi feita mais uma repetição com o mesmo meio de cultura, mas em lugar de H₂SO₄ foi acidificado com 0,02 N HCl. O pH do meio com diferentes quantidades de ácido foi medido:

1)	100 ml de meio +	4,3 ml 0,02 N NaOH	pH 7,0
2)	100 ml de meio +	0 ml 0,02 N NaOH	pH 6,2
3)	100 ml de meio +	2 ml 0,02 N HCl	pH 5,5
4)	100 ml de meio +	4 ml 0,02 N HCl	pH 4,9
5)	100 ml de meio +	6 ml 0,02 N HCl	pH 4,4
6)	100 ml de meio +	8 ml 0,02 N HCl	pH 4,2

O meio, assim preparado, foi passado a placas de PETRI e inoculado com duas culturas de *azotobacter*:

A Cultura pura de *Azotobacter chroococcum* Beijerinck

Ai impura, isolada recentemente dum solo com pH 4,85.

Ambas as culturas se desenvolveram com abundância no meio 1. No meio 2 o crescimento já foi mais fraco e nos meios 3 e 4 muito fraco. As outras placas ficaram sem crescimento (Fig 7 e 8).

2 — Meios constituídos por solo ácido

Notando que o *azotobacter* em meio de cultura ácido só se pode desenvolver fracamente, procuramos assemelhar as condições do laboratório às do solo. A acidez do solo é outra que a do H₂SO₄ ou HCl puro. Efetuámos então ensaios em que ao meio de cultura foram adicionados os solos ácidos. 5 g de solo com 50 g do meio 77 de FRED e WAKSMAN (7) sem

CaCO₃ em frascos de Erlenmeyer de 200 ml foram esterilizadas três dias consecutivos, durante uma hora, diariamente, no autoclave com 120°C. Observámos que esta esterilização é suficiente para matar todos os germens do solo. Para a inoculação usamos três diferentes culturas:

- A Cultura pura de *Azotobacter chroococcum* Beijerinck
- Ai Cultura impura de *azotobacter* isolada recentemente dum solo com pH 4,85 (solo 1 da tabela I).
- T' Bactéria encapsulada encontrada frequentemente associada à *azotobacter*.

As combinações foram A, Ai e A + T. Os solos usados foram os seguintes:

- N.º 7 da tabela I com pH 7,20
- N.º 3 da tabela I com pH 5,75
- N.º 2 da tabela I com pH 5,00
- N.º 4 da tabela I com pH 4,90
- N.º 1 da tabela I com pH 4,85

No fim de três dias observamos que os frascos inoculados com A ficaram todos estéreis. Os frascos inoculados com A + T' mostraram todos uma película mucilaginosa contendo, em exame microscópico:

No frasco com solo n.º 7... 80 % de *azotobacter* e 20 % de bactéria encapsulada.

No frasco com os outros solos, 50 % de *azotobacter* e 50 % de *bactéria* encapsulada.

Os frascos inoculados com Ai mostraram um forte crescimento, a película contendo quase só células de *azotobacter*:

No frasco com solo n.º 7 uma película fortíssima;

Nos frascos n.º 3 e 4 muitas bolhas de gás (ácido butírico produzido por *Amylobacter*) formando, com a película de *azotobacter* uma grossa espuma.

Nos frascos n.º 2 e 1 pouca produção de gás, película bem formada.

No fim da incubação de dez dias a situação foi quase a mesma.

O mesmo ensaio foi repetido com solos com pH crescentes. Para controlar a capacidade tampão foram determinados os ppHH do solo junto com o meio:

<i>solo</i> (N.º da tabela I)	<i>pH do solo</i>	<i>pH do solo</i> <i>+ meio</i>
solo pobre I	3,50	4,0
solo pobre II	4,05	4,5
N.º 1	4,85	5,2
N.º 4	4,90	5,3
N.º 6	5,60	5,8
N.º 3	5,75	5,8
N.º 5	6,25	6,6
N.º 7	7,20	7,0

Sete dias depois da inoculação observamos os seguintes resultados:

Frascos inoculados com A — todos estéreis.

Frascos inoculados com A + T.

com solos N.º I — são estéreis.

N.º II — têm poucas bolhas de gás e em exame microscópico observamos algumas células de *azotobacter*.

N.º 1, 4 e 6 — mostram uma película bem formada e no exame microscópico 40 % de *azotobacter* 60 % de bactéria encapsulada.

N.º 3, 5 e 7 — têm uma película bem formada contendo, pelo exame microscópico 70 % de *azotobacter* e 30 % de bactéria encapsulada.

Frascos inoculados com Ai

com solos N.º I — são estéreis.

N.º II — mostram bôlhas de gás com pouca formação de película, o exame microscópico mostra algumas células de *azotobacter*.

N.º 1, 4, 6, 3 e 5 têm grossa espuma, contendo população predominante de *azotobacter*.

N.º 7 tem uma película escura, grossa, contendo *azotobacter* quase puro.

3 — *Segunda conclusão*

Dêstes trabalhos podemos concluir:

- 1.º — que o *azotobacter* não se desenvolve bem no meio de cultura sólido ácido, com pH em baixo de 6.
- 2.º — que o *azotobacter* em cultura impura se desenvolve bem no meio de cultura acidificada por solos ácidos, até o pH 5,2, e fracamente, até o pH 4,5.
- 3.º — que no meio 77 de FRED e WAKSMAN (7) sem CaCO₃, esterilizado, com diferentes solos, o *Azotobacter chroococcum* Beijerinck em cultura pura não se pode desenvolver.

IV — ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO DO AR

Para a capacidade de fixação de nitrogênio das tribos de *azotobacter* em nossos solos, só podem ser mencionados dados aproximados, porém, pelos números abaixo citados tem-se uma idéia da quantidade de nitrogênio atmosférico que pode ser fixado, sob certas condições. Esta quantidade é perceptível e não parece depender do pH do solo.

Métodos

Para a determinação do nitrogênio fixado por culturas puras de *azotobacter* inoculámos com uma suspensão, 100 ml

de meio de LIPMAN (5), em frascos de ERLÉNMEYR de 1 litro. No fim de uma incubação de 21 dias, foi constatado, pelo método de KJELDAHL, o aumento de nitrogênio nos frascos inoculados em relação aos testemunhas.

Para determinar a fixação de nitrogênio do solo incubamos, por 21 dias 50 ml do meio 77 de FRED e WAKSMAN com 5 g de solo em frascos de ERLÉNMEYR de 300 ml (por causa da ventilação). A determinação de nitrogênio foi feita pela Seção de Fertilidade do Solo, pelo método normal de KJELDAHL. Foram feitas 3 determinações, as 2 primeiras sobre a fixação de N de *azotobacter*, em cultura pura, e a terceira de 5 diferentes solos. Cada cultura foi criada e determinada em duplicata: (a, b). Para observar o comportamento de *azotobacter* com CaCO_3 , as culturas com solo foram criadas com e sem CaCO_3 . Os números abaixo citados indicam mg N fixado da atmosfera com 1 g de manitol.

Fixação de N de Azotobacter chroococcum Beijerinck em cultura pura

1.^a determinação:

- a) 8,3 mg N de 1 g de manitol
- b) 8,3 mg N de 1 g de manitol

2.^a determinação:

- a) 6,8 mg N de 1 g de manitol um pouco contaminado
- b) 10,0 mg N de 1 g de manitol

Fixação de N no solo:

3.^a determinação:

Solo A com pH 5,3 — sem CaCO_3	a) — 0 mg N de 1 g de manitol
	b) — 0 mg N " " " " "
— com CaCO_3	a) — 4,2 mg N " " " " "
	b) — 1,4 mg N " " " " "
Solo B com pH 4,38 — sem CaCO_3	a) — 16,2 mg N " " " " "
	b) — 13,4 mg N " " " " "

	— com CaCO ₃	a) — 10,6 mg N de 1 g de manitol
		b) — 13,4 mg N " " " " "
Solo C com pH 4,22	— sem CaCO ₃	a) — 0 mg N " " " " "
		b) — 0 mg N " " " " "
	— com CaCO ₃	a) — 3,5 mg N " " " " "
		b) — 5,1 mg N " " " " "
Solo D com pH 3,94	— sem CaCO ₃	a) — 0 mg N " " " " "
		b) — 0 mg N " " " " "
	— com CaCO ₃	a) — 0,3 mg N " " " " "
		b) — 0,3 mg N " " " " "
Solo E com pH 7,20	— sem CaCO ₃	a) — 0 mg N " " " " "
		b) — 0 mg N " " " " "
	— com CaCO ₃	a) — 2,5 mg N " " " " "
		b) — 7,2 mg N " " " " "

Dêstes resultados pode deduzir-se que: o *azotobacter* fixa quantidades consideráveis de nitrogênio atmosférico na natureza. Segundo BERTHELOT (1) as bactérias livres podem fixar 16 até 25 kg/ha do nitrogênio do ar por ano. TCHAN (3) menciona de 10 até 40 kg/ha em zonas temperadas. Indicações análogas das zonas tropicais, ainda, não encontramos. Estas quantidades representam somente um terço da necessidade, nas culturas intensivas européias; mas 20 kg/ha de N por ano, muito pode representar em nossa agricultura extensiva.

A capacidade de fixação do solo é ditada pela fonte energética. E' que o *azotobacter* não pode desdobrar a celulose, mas só mono- e di-sacarídeos e outros álcoois; a sua ação é limitada. A. KOCH (13) relata experimentos em que a adição de açúcares ao solo consegue uma assimilação de 10 mg de N por 1 g de açúcar. A colheita foi aumentada consideravelmente. Em condições favoráveis o *azotobacter* predomina e seu número aumenta rapidamente. Na Europa, uma adubação com açúcares não pode ser feita, por causa do preço alto do açúcar; mesmo os restos da indústria de açúcar são aproveitados, vantajosamente, para a alimentação do gado. Mas em regiões de produção de cana, uma adubação com resíduos da fabricação de açúcar, poderia ter

mais valor como adubo que o seu uso para combustível. Ensaio sobre este assunto estão em preparo.

O problema da inoculação do solo ou da semente com *azotobacter* até hoje, ainda, está sem solução. Enquanto vários autores da Alemanha não puderam observar aumentos da colheita com inoculação com *azotobacter*, observou-se na Rússia grande sucesso, especialmente com tabaco, provocando um aumento até de 45 % (15). Também WAKSMAN (2) julga sem valor uma inoculação com *azotobacter* sem um prévio melhoramento do solo, pois em quase todos os solos *azotobacter* e *amylobacter* estão presentes. Uma inoculação é proveitosa em um solo melhorado, cujas condições anteriores ao melhoramento consistem, em primeiro lugar, numa adubação com cal, que aumente o pH pelo menos até 5; segundo, uma adubação com matéria orgânica contendo açúcar e em terceiro lugar um bom preparo e sombreamento do solo. Uma adubação com adubos contendo nitrogênio não seria favorável, porque, segundo WINOGRADSKY (6) o desenvolvimento de *azotobacter* em solos pobres de N é mais intenso, por falta da concorrência dos outros microorganismos.

V — SUMÁRIO

No presente trabalho se trata da ocorrência do agente fixador de nitrogênio no solo, o *azotobacter*, na área do Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas, situada na Baixada de Sepetiba.

Foram examinadas 27 diferentes amostras pelo método de meio líquido e pelo método de WINOGRADSKY usando placas de sílica-gel. Embora 18 destas amostras tivessem um pH abaixo de pH 6 e três abaixo de pH 5, foi possível isolar *azotobacter* de 22 destes 27 solos. Os solos mais ácidos nos quais foram encontradas esta bactéria tiveram o pH 4,85 — 4,82 e 4,62.

As tribos isoladas puderam ser identificadas como *Azotobacter chroococcum* Beijerinck com grandes células, aos pares, e com pigmento castanho-escuro, não se tratando,

pois de *Azotobacter indicum* Starkey, isolado por STARKEY em solos ácidos da Malaia, o qual se caracteriza por crescimento muito lento, por células pequenas e por ausência de qualquer pigmento.

Procurou-se manter as culturas em meios ácidos. No meio de agar-agar puro, acidificado com H_2SO_4 ou HCl , só foi observado crescimento até o pH6. Adicionado ao meio de cultura 10 % de solo ácido, em lugar do ácido, o *azotobacter* suportou melhor a acidez e até pH 5,2 foi possível observar forte desenvolvimento.

A capacidade de fixação de nitrogênio das tribos de *azotobacter*, isoladas no presente trabalho, pode ser comparada às das zonas temperadas.

VI — ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Vorkommen des frei im Boden lebenden Stickstoffbinders *Azotobacter* in den Boeden auf dem Galaende des Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas (Nationalas Lehr — und Forschungszentrum fuer Landwirtschaft), 70 km oestlich von Rio de Janeiro, Brasilien.

Es konnte aus 22 der 27 verschienden Bodenproben, von denen 18 einen geringeren pH-Wert aufwisen als pH 6, *Azotobacter* isolierte werden konnte, hatten eine Wasserstoffionenkonzentration von pH 4,85 — 4,82 und 4,62. Die isolierten Staemmen wurden als das irosszellige *Azotobacter chroococcum* Beijerinck mit braunschwarzen Pigment identifiziert. Es handelt sich demnach nicht um *Azotobacter indicum* Starkey, die einzige bisher in sauren Boeden beschriebene Azotobakterart, die kleinzellig ist und kein Pigment bildet.

Es wurde versucht die isolierten Azotobakterkulturen auf sauren Naehrboeden zu zuechten. Waehrend sie sich auf einem Agarnaehrboden mit einem pH-Wert unter 6 schlecht entwickelten, konnten si in Naehrloesungen mit 10 % Bodenzusatz bis zu pH 5,2 zu kraeftigem Wachstum gebracht werden.

Die Stickstoffbindung dieser Azotobakterstaemme duerftke aenheliche Werte erreichen wie die in den gematessigten Zonen.

VII — SUMMARY

The occurence of the non-symbiotic, nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter* in the área of the Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas, 42 miles east of Rio de Janeiro, Brazil, is described in this paper. It was possibile to isolate *Azotobacter* from 22 out 27 soil-samples of which 18 showed a pH less than pH 6. The most acid soils, where *Azotobacter* could be found had the pH 4.85 — 4.82 and 4.62. The isolated strains were identified as the large-celled *Azotobacter chroococcum* Beijerinck with blackish-brown pigment. Therefore the bacteria in question is not the *Azotobacter indicum* Starkey, so for the only species of *Azotobacter* found in acid soils, which has been described as smallcelled and no pigment-forming.

It was also tried to cultivate the isolated *Azotobacter*-strains in acid culture-media. While their development on pure agar-medium with less than pH 6 was very poor, it was observed a luxuriant growth on diquid-medium with 10 % acid soil up to pH 5.2.

The amount of nitrogen combined by these *Azotobacter*-strains might be the same as that one of the strains from the temperate zones.

AGRADECIMENTOS

Tornamos públicos os nossos agradecimentos aos técnicos que contribuíram para a execução do presente trabalho.

- 1) DR. WALDEMAR MENDES, Chefe da Seção de Fertilidade do Solo, por tôdas as facilidades que nos proporcionou.
- 2) SR. JOSÉ DOMINGUES DOS SANTOS, fotógrafo do Inst. Ecol. Exp. Agrícolas, pela perfeição do seu trabalho técnico.
- 3) LUIZ RODRIGUES DE SOUZA, funcionário da Seção de Fertilidade do Solo, pelas determinações de nitrogênio.

VIII — LITERATURA CITADA

- 1) RIPPPEL-BALDES, Allgem, Mikrobiologie, Springer-Verlag 1952.
- 2) WAKSMAN, Principles of Soil Microbiology. The Williams and Wilkins Company, 1932.
- 3) POCHON e TCHAN, Precis de Microbiologie du sol. Masson et Cie Editeurs, Paris 1948.
- 4) VERONA, Elementi di Microbiologia Pedologica. L. Macri Editore, Firenze, 1947.
- 5) GALLEGO y QUERO, Compendio de Microbiologia del suelo, Instituto Florestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid 1949.
- 6) WINOGRADSKY, Microbiologie du sol, Masson et Cie Editeurs, Paris 1948.
- 7) FRED AND WAKSMAN, Laboratory Manual of General Microbiology. McGraw-Hill Book Company Inc., New York and London 1928.
- 8) MALTSCHESKY, Zeitschr. f. Pflanzenernahrung 42, 3, 1949.
- 9) STAPP, Zentralbl. f. Bakteriologie, Band 102 II 1940.
- 10) STARKEY, Soil sci. 47, 329 (1939).
- 11) ALTON, J. Agricult Sci. 26, 268 (1936).
- 12) JENSEN, Proc Linn Soc. N. S. Wales 72, 299 (1948).
- 13) KOCH, Zentralbl. f. Bakteriologie II, 27, 1 (1910).
- 14) FAGUNDES A. B., VETTORI, DEL NEGRO e RAMOS, Contribuição para o estudo dos solos da Baixada de Sepetiba. Anais da primeira Reunião Brasileira de Ciências do Solo. Rio de Janeiro 1947.
- 15) POSCHENRIEDER, Landwirtsch. Jahrbuch f. Bayern 26, 9/10 (1949).

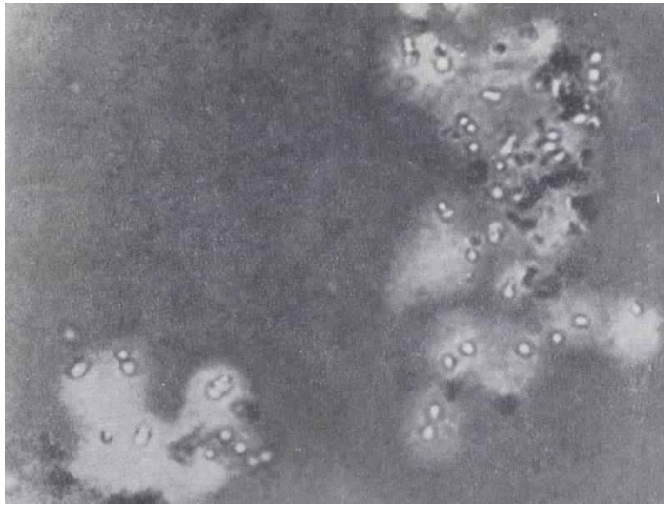


Fig. 1
Camada mucosa em cima do meio inoculado com terra. Preparação negativa (Burri) mostrando as massas mucilaginosas circundando as células de *Azotobacter chroococcum* BELJERINCK (620 x).

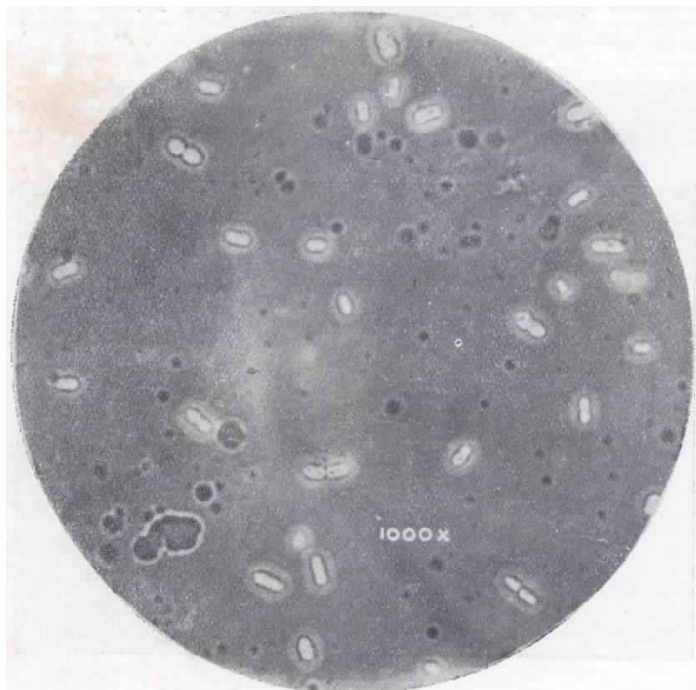


Fig. 2
Azotobacter chroococcum BELJERINCK; cultura 24 horas de idade. Preparação negativa (Burri) (1000 x).

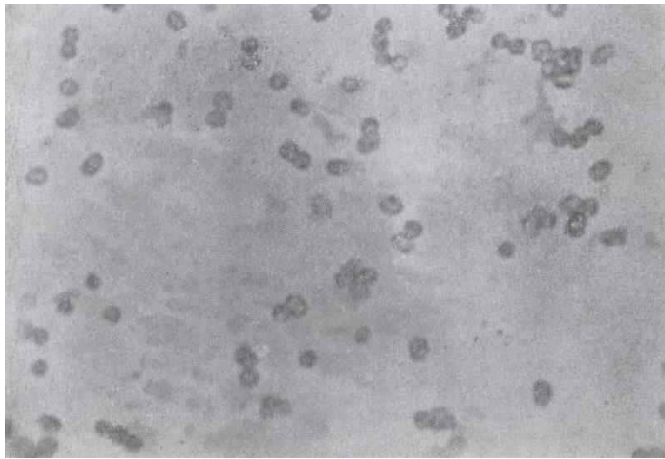


Fig. 3

Azotobacter chroococcum BELJERINCK; coloração de erythrosina fenicada (1150 x).

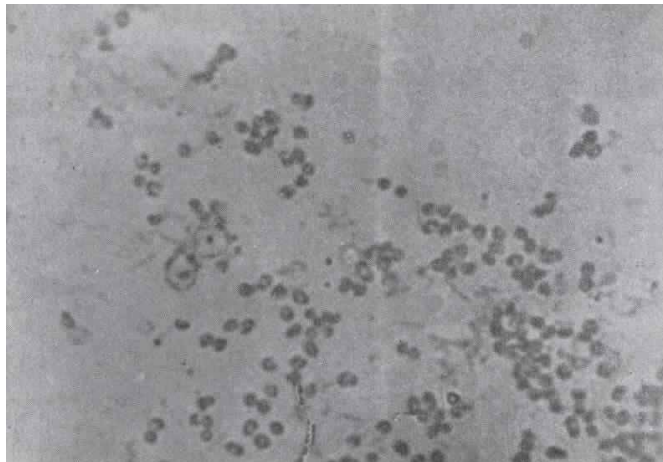


Fig. 4

Cultura impura de *azotobacter* isolado dum solo com pH 4,85 (1150 x).

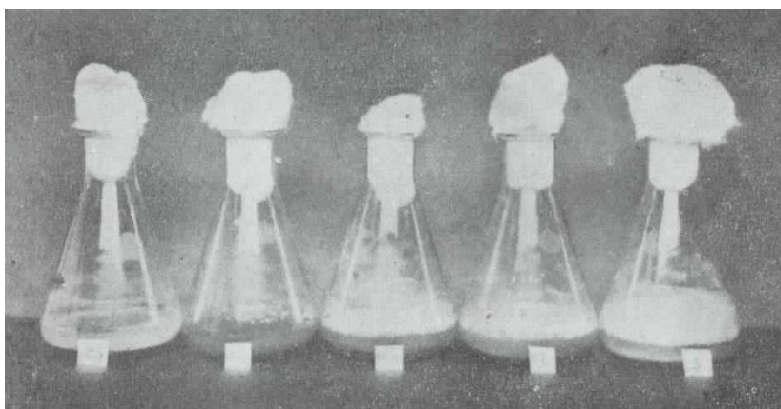


Fig. 5

Frascos de Erlenmeyer com meio 77 inoculado com terra ácida mostrando a espuma, produzida pelas bolhas de gás de *Bacillus amylobacter* e pela massa mucosa do *azotobacter*. Frasco 25 recentemente inoculado; frasco II com pouca produção de gás, camada escura de *azotobacter*; nos frascos 10, 1 e 5 muita produção de gás por *Bacillus amylobacter*.

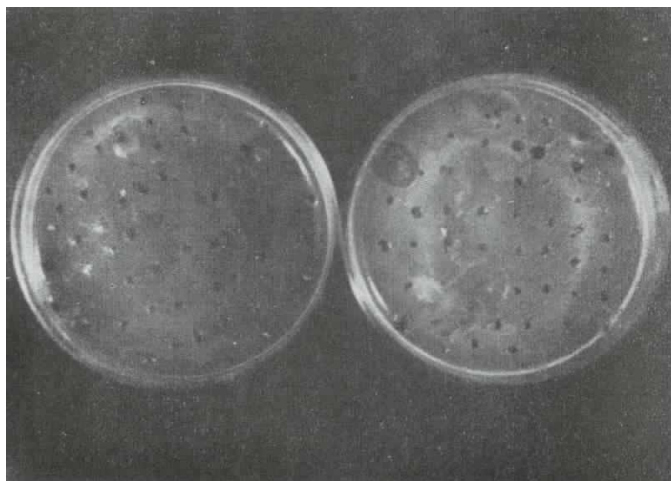


Fig. 6

Placas de sílica-gel, inoculadas com terra ácida mostrando poucas colônias de *azotobacter*.

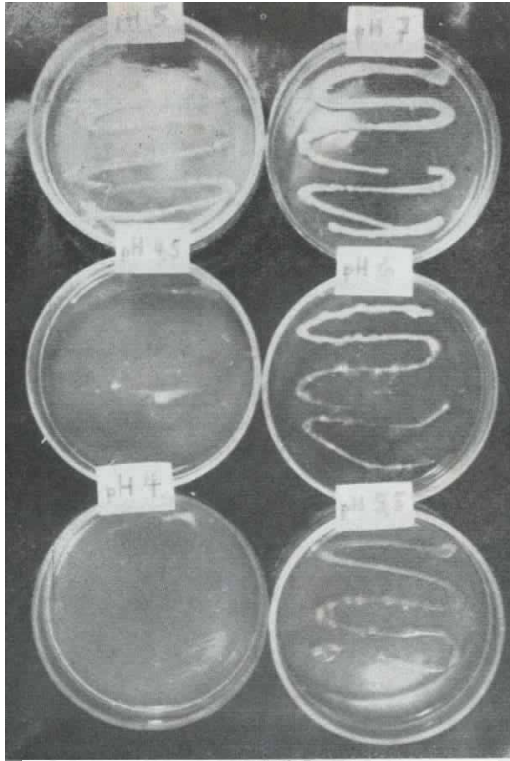


Fig. 7

Placas com agar-agar de acidez diferente inoculadas com uma cultura de *azotobacter*.

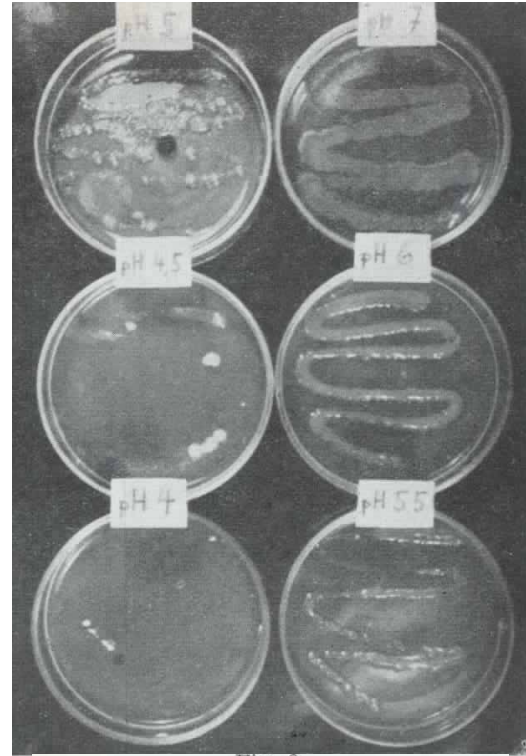


Fig. 8

Placas com agar-agar de acidez diferente inoculadas com uma cultura impura de *azotobacter* isolada dum solo com pH 4,85,

**BOLETINS DO INSTITUTO DE ECOLOGIA
E EXP. AGRÍCOLAS**

Ns.

- 1 — Ensaio de Adubação de Fumo na Bahia. Carlos Barbosa de Souza e G. J. Fisher. 1941.
- 2 — Contribuição ao Conhecimento dos Têxteis Nacionais. Okiro de Senna Braga e Wittus Christiano Wöllner. 1941 (2.^a Ed. 1950).
- 3 — Causas determinantes do reverdecimento de laranjas maduras em colheitas pendentes, e do secamento das macro-células da polpa dos frutos, na região peduncular. José Eurico Dias Martins. 1942.
- 4 — A broca da cana de açúcar e seus parasitos em Campos, Estado do Rio de Janeiro, Herval Dias de Souza. 1942.
- 5 — Experimento fatorial de adubação (trigo e linho). Raul Edgar Kalkmann. 1943.
- 6 — Investigações básicas para o melhoramento da mamoneira. Grijalva Rodrigues Fernandes. 1944.
- 7 — Contribuição para o melhoramento do guando (*Cajanus indicus* Spreng). Osvaldo Bastos de Menezes. 1951.
- 8 — Catálogo dos Erotylideos (Col.) das coleções do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas, com a descrição de algumas espécies novas. Jacinto Guérin. 1948.
- 9 — Comportamento de combinações híbridas simples, complexas e sintéticas do milho (*Zea mays* L.). Osvaldo Bastos de Menezes. 1952.
- 10 — IV — Melhoramento da Batata Doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam. Ciclo Vegetativo — Osvaldo Bastos de Menezes. 1952.