

BACTÉRIAS ASSIMBIÓTICAS FIXADORAS DE N NA RIZOSFERA DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

(NITROGEN FIXING ASSIMBIOTIC BACTERIA ON THE RHIZOSPHERE OF GRAMINEOUS FORAGE PLANTS)

A. P. RUSCHEL

JA. DÖBEREINER

(Ministério da Agricultura, Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro Sul, Guanabara, Brasil).

Summary — Rhizosphere effects of the pasture grasses *Digitaria decumbens*, *Panicum purpurascens*, *Cynodon dactylon*, *Melinis minutiflora*, *Paspalum notatum*, *Setaria sphacelata*, *Cynodon plectostachyus*, were studied under field conditions and in the greenhouse. Special attention was given to the nitrogen fixing organisms of the genera *Azotobacter* and *Beijerinckia*. The following conclusion were drawn from these experiments: 1 — All pasture grasses except one showed favorable effects on *Beijerinckia* in their rhizosphere. In the greenhouse experiment this effect was still more pronounced on the root surface (Rhizoplan). 2 — Under field conditions, some of the grasses favored *Azotobacter* growth in their rhizosphere. 3 — Adding nitrogen to the soil decreased the number of nitrogen fixing organisms but tended to increase other groups of microorganisms.

Sumário — No presente trabalho estudamos o efeito da rizosfera de *Digitaria decumbens*, *Panicum purpurascens*, *Cynodon dactylon*, *Melinis minutiflora*, *Paspalum notatum*, *Setaria sphacelata*, *Cynodon plectostachyus*, em certos microorganismos do solo, especialmente sobre as bactérias assimbióticas fixadoras do nitrogênio atmosférico, dos gen. *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Observações preliminares em condições naturais no campo foram posteriormente confirmadas em casa de vegetação. Nossos resultados nos permitem tirar as seguintes conclusões: 1 — Todas as gramíneas, com exceção de *Melinis minutiflora* propiciaram melhor desenvolvimento de *Beijerinckia* em sua rizosfera. No experimento de casa de vegetação este aumento foi mais acentuado no "rizoplan". 2 — No ensaio de campo algumas gramíneas favoreceram mais o desenvolvimento das bactérias do gên. *Azotobacter*, em sua rizosfera que outras. 3 — O nitrogênio adicionado ao solo diminuiu o número de bactérias fixadoras de nitrogênio, tendendo aumentar outros grupos de microorganismos.

Introdução

O efeito benéfico da adubação nitrogenada no solo com pastagens já é bem conhecido; entretanto pouco se conhece sobre os acréscimos de N que os microorganismos assimbióticos podem dar a diferentes solos. Um dos autores (6) estudando as bactérias do gên. *Beijerinckia* na rizosfera de algumas gramíneas notou que as plantas estudadas favoreceram o desenvolvimento desta bactéria no solo aderido às raízes; no mesmo experimento, o *Paspalum notatum* quando inoculado apresentou maior quantidade de N que o sem inoculação, o que vem a confirmar a importância das bactérias fixadoras de N no solo. Necessário lembrar aqui a importância das reações de troca entre a planta e a bactéria, as quais segundo Starkey (7) são as mais diversas possíveis.

A evidência do efeito favorável no desenvolvimento das bactérias fixadoras de N na

rizosfera das gramíneas forrageiras justifica um estudo mais detalhado da fixação assimbiótica no sentido de suprir as necessidades de N do solo, estudo este um pouco intrincado. Autores da escola russa (4, 9, 10) informam sobre sucessos obtidos com inoculação de *Azotobacter* em grande variedade de plantas. No entanto, em outros países experimentos feitos com esta mesma bactéria nada provaram neste sentido (3).

Material e métodos

Na realização deste trabalho utilizamos um ensaio com amostras retiradas no campo e um experimento em casa de vegetação.

1. ENSAIO COM AMOSTRAS DE CAMPO

Colhemos amostras de solo da rizosfera das seguintes gramíneas: Pangola comum (*Digitaria decumbens* Stent), Pangola A-24 (*Digitaria decumbens* Stent), Angola (*Panicum*

QUADRO 1

EFETO DA RIZOSFERA DE GRAMINEAS FORRAGEIRAS NO pH DO SOLO E NO DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO, EM CONDIÇÕES DE CAMPO. (OS VALORES REPRESENTAM DETERMINAÇÕES EM UMA AMOSTRA DE SOLO COMPOSTA DE TRÊS SUB-AMOSTRAS)

Gramíneas	pH			Número de Beijerinckia/lg de Solo (Microcolônias)			Número de Azotobacter/lg de Solo (Microcolônias)		
	Test.	Rizosfera	Rizoplan	Test.	Rizosfera	Rizoplan	Test.	Rizosfera	Rizoplan
Pangola comum	5,8	6,0	6,1	10	3	0	0	0	0
Pangola comum A 24	5,6	5,2	5,6	3	58	223	0	8	0
Angola	5,9	5,3	5,8	0	0	97	0	0	63
Bermuda	5,3	5,3	5,6	23	343	190	0	3	16
<i>Paspalum</i>	4,7	5,1	5,1	63	416	347	0	1260	803
Gordura	4,9	4,9	4,9	0	0	0	0	0	0
Marangá	4,9	5,4	5,5	813	357	347	0	106	153
Estrêla	5,4	6,5	6,4	0	0	100	0	420	256

purpurascens Raddi), Bermuda Suwaneese (*Cynodon dactylon* (L.) Pers), Gordura (*Meibomia minutiflora* Beauv.), Forquilha (*Paspalum notatum* Flugge), Marangá (*Setaria sphacelata* (Schum.) Stapf. & Hub.) Estrêla (*Cynodon plectostachyum* (K. Shum.) Pilger).

Retiramos 3 blocos de cada gramínea e para cada bloco tivemos amostras testemunhas (solo próximo a cultura, livre de vegetação). No laboratório, sacudimos as raízes, retirando o excesso de solo que nelas estava contido, o qual viria a constituir a amostra da rizosfera; o solo que ficou aderido às raízes após breve secagem ao ar, foi retirado e constituiu a amostra do "rizoplan".

O solo da rizosfera dos três blocos da mesma gramínea foi bem misturado e constituiu uma única amostra, o mesmo acontecendo com as três amostras do "rizoplan" e as das testemunhas de cada bloco. Nestas amostras fizeram-se as seguintes análises:

1.1. ANÁLISE DE PH — Numa suspensão de solo em água (1:1) determinado pelo potenciômetro ELL.

1.2. NÚMERO DE MICROCOLÔNIAS DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO — Foram contadas distribuindo-se 0,1 g de solo seco ao ar e tamisado a 1 mm, em placas de sílica-gel impregnadas com solução de Winogradsky com pH 6,5. As primeiras colônias que apareceram nas placas, 48 horas após inoculadas, eram de *Azotobacter*; as que foram contadas 8 a 10 dias depois, do gên. *Beijerinckia*.

2. EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO Usamos solo arenoso classificado como hidromórfico, da área territorial do I.P.E.A.C.S., com pH 4,5 o qual foi uniformemente inoculado com cultura diluída de *Beijerinckia*.

O esquema experimental foi de blocos ao acaso com 4 repetições. Tivemos os mesmos tratamentos que no ensaio de campo com exceção dos capins Marangá e Estrêla, em solo com e sem Nitrogênio.

Fizemos as seguintes determinações:

2.1. ANÁLISE DE PH

2.2. N.º DE MICROCOLÔNIAS FIXADORAS DE N. — Como já foi descrito no item 1.2.

2.3. CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM GERAL, BACTÉRIAS QUE NÃO REQUEREM AMINO-ÁCIDOS, FUNGOS E ACTINOMICETOS — Utilizamos o "método de placas" que consiste em se inocular placas com meio de cultura seletivo com determinada diluição. Para as bactérias em geral, fungos e actinomicetos usamos um meio de cultura com albumina de ovo e para as bactérias que não requerem amino-ácidos o mesmo meio, onde a albumina de ovo foi substituída por nitrato. A diluição usada foi de 1:10.000.

2.4. DETERMINAÇÃO DO PÊSO SECO DAS PLANTAS

Resultados e discussão

A contagem preliminar apresentada no Quadro 1 do número de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera de oito gramíneas forrageiras, no campo, confirma resultados anteriores com outras espécies da mesma família (1, 2, 6). O efeito das gramíneas no pH do solo, em sua rizosfera, indica que substâncias estão sendo excretadas por estas plantas, as quais favorecem certos grupos de microorganismos. A maioria das gramíneas favoreceu o desenvolvimento de bactérias fixadoras de N. Observamos ainda que as gramíneas *Cynodon plectostachyus*, *Setaria sphacelata*, *Paspalum notatum* tiveram efeito favorável não só no número de *Beijerinckia*, como também no número de *Azotobacter*. Sendo as bactérias deste último gênero conhecidas como sensíveis a acidez do solo, o aumento do pH na rizosfera das referidas gramíneas, possivelmente pode ser responsável pelo desenvolvimento destas bactérias.

O experimento de estufa, executado em condições controladas e com solo uniforme, confirmou os resultados de campo (Quadro 2); o capim Gordura parece que foi a única gramínea que não favoreceu o desenvolvimento de *Beijerinckia* no solo. Todas as demais gramíneas apresentaram em sua rizosfera um número de fixadoras de nitrogênio mais elevado do que nos potes sem plantas, o que é demonstrado pela análise de variância das amostras da rizosfera. Comparando-se o mesmo efeito também no "rizoplan" este foi novamente significativo.

O nitrogênio adicionado ao solo aumentou muito a produção das forrageiras o que mostra que nas condições do experimento, se houve fixação assimiótica de N, esta não foi suficiente para suprir as necessidades da planta; este fator negativo pode ser atribuído às condições de solo, que foram bastante adversas ao desenvolvimento das bactérias do gên. *Beijerinckia*, pois não foram encontradas no solo em condições naturais, e mesmo após a inoculação, seu número permaneceu relativamente baixo. Os efeitos favoráveis no desenvolvimento das bactérias fixadoras de N, neste experimento, foram exclusivamente devidos à planta.

Como era de se esperar o nitrogênio adicionado ao solo prejudicou o desenvolvimento da *Beijerinckia* nos diferentes tratamentos favorecendo outros microorganismos; este equilíbrio microbiano está aparentado no Quadro 3. Segundo West e Lochhead (11) existem microorganismos que requerem amino-ácidos para seu máximo desenvolvimento e outros que o dispensam; sendo assim os menos exigentes, quando na presença de amino-ácidos, seriam dominados pelos outros.

QUADRO 2

EFEITO DA RIZOSFERA DE GRAMINEAS FORRAGEIRAS NO pH DO SOLO E NO DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO, EM CASA DE VEGETAÇÃO*. (OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE 4 VASOS)

Gramíneas	pH		(N.º de microcolônias de bactérias fixadoras de N/1g de solo*)		
	Rizosfera	Rizoplan	Rizosfera	Rizoplan	Pêso sêco
Solo sem N					
Pangola comum	4,4	4,8	91	203	17,7
Pangola A-24	4,9	5,1	101	282	22,4
Angola	4,5	4,6	107	160	13,2
Bermuda Suwanee	5,0	4,8	85	243	12,8
<i>Paspalum</i>	5,1	5,1	117	147	27,0
Gordura**	—	—	2	11	3,7
Testemunha (sem planta)	4,4	—	56	—	—
Solo com NH ₄ NO ₃					
Pangola comum	4,2	4,8	156	137	45,7
Pangola A-24	4,5	4,7	26	63	40,2
Angola	4,3	4,4	96	115	45,0
Bermuda Suwanee	4,6	5,2	39	75	30,9
<i>Paspalum</i>	4,7	4,7	67	222	48,2
Gordura**	—	—	11	22	16,1
Testemunha (sem planta)	4,4	—	17	—	—

A análise da variância, após transformação em $\sqrt{x + 1}$, e feita excluindo as testemunhas, revelou efeito do nitrogênio e da rizosfera tanto no pH como no número de bactérias fixadoras de nitrogênio e diferenças entre plantas para o pH. Fazendo-se aná-

lise de variância das amostras da rizosfera, incluindo os potes testemunhas, verificou-se aumento significativo do número de bactérias fixadoras de N na rizosfera de Pangola A-24, Pangola comum, Angola e *Paspalum*.

*) Neste experimento somente tínhamos *Beijerinckia*.

**) Os dados do capim gordura foram incompletos e não foram incluídos na análise da variância.

A hipótese da estimulação seletiva das bactérias que requerem amino-ácidos na rizosfera de grande número de plantas é demonstrada por Lochhead & Rouatt (5) e outros autores (7). O aumento seletivo do número de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera das gramíneas estudadas (Quadro 3), no entanto, indica-nos que as excreções radícula-

res destas espécies estão constituídas predominantemente de substâncias não nitrogenadas.

Os resultados deste experimento como o de anteriores (6) nos leva a crer que as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ocupar posição de destaque no balanço da economia de nitrogênio em solos sob pastagens.

QUADRO 3

EFEITO DA RIZOSFERA DE GRAMÍNEAS NO SEU EQUILÍBRIO MICROBIANO (OS DADOS REPRESENTAM MÉDIAS DE 5 GRAMÍNEAS ALÉM DAS TESTEMUNHAS SEM VEGETAÇÃO, EM DUAS REPETIÇÕES DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO) *

	Solo sem nitrogênio			Solo com nitrogênio		
	Test.	Rizosfera	Rizoplan	Test.	Rizosfera	Rizoplan
Meio com Albumina						
N.º x 1000/1g de solo						
Bactérias	1480	1230	1510	1240	1240	2010
Fungos	67	83	78	53	75	94
Actinomicetos	62	80	58	66	89	132
Meio com NO₃						
N.º x 1000/1g de solo						
Bactérias	1200	930	990	1520	900	1500
Silica gel sem N						
N.º de microcolônia 1g de solo						
<i>Beijerinckia</i>	45	128	275	25	84	107

* Os dados do Capim gordura não estão incluídos nestes resultados. Os resultados deste Quadro estão apresentados em conjunto de todas as plantas, pois não foram observadas diferenças significantes entre as diferentes gramíneas.

Bibliografia

1. DOBEREINER, J. 1959. Rev. Brasil. Biol., 19, 251-258.
2. DOBEREINER, J. e A. P. RUSCHEL, 1961. Rev. Brasil. Biol., 21, 397-407.
3. JENSEN, H. L. 1940. Proc. Linn. Soc. N. S. Wales, 65, 1-122.
4. KROLL, L. e S. ERDEL. 1952. Agrokhémia és Talaj, 1, 369-372. (Cit. Biol. Abstr., 28, 2408).
5. LOCHHEAD, A. G. e J. W. ROUATT. 1955. Soil. Sci. Soc. Am. Proc., 19, 48-49.
6. RUSCHEL, A. P. e D. P. P. S. BRITO. 1963. Comunicado técnico IEEA. (no prelo).
7. STARKEY, R. L. 1958. Bacteriol. Rev., 22, 154-172.
8. STARKEY, A. G. 1961. Relationship of Microorganisms to Plant Growth: the Rhizosphere Microorganisms of the Rhizosphere: Facts and Speculations, p. 601-604. Recent Advances in Botany. University of Toronto Press.
9. VAGNEROVA, K. 1955. Sborn. Csl. Acad. Zemed. Ved., 28, 208-210.
10. VANCURA, V., J. MACURA, e O. FISHER. 1959. Folia Microb., 4, 119-129.
11. WEST, P. M. e A. G. LOCHHEAD, 1940. Soil Sci., 50, 409-420.