

OCORRÊNCIA DE *Azotobacter chroococcum* EM ALGUNS SOLOS DE PIRACICABA (*)

FERDINANDO GALLI

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de S. Paulo

INTRODUÇÃO

Os principais agentes da fixação biológica do nitrogênio atmosférico são as bactérias dos nódulos das raízes das leguminosas, que promovem a chamada fixação simbiótica daquele elemento quando em associação com as plantas leguminosas, e as bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Clostridium*, responsáveis pela fixação livre ou não simbiótica do mesmo elemento. A importância econômica da fixação simbiótica está de há muito reconhecida e assentada, sendo enorme a literatura a isso concernente. Por outro lado, porém, não está ainda, definitivamente esclarecido o papel dos microorganismos fixadores não simbióticos na restauração do teor em nitrogênio dos solos. Não obstante, grande tem sido o número de trabalhos referentes às condições que governam a existência de *Azotobacter* e *Clostridium* nos solos. Uma revisão da literatura mostra que o segundo é de ocorrência generalizada, ao passo que a distribuição de *Azotobacter* está sujeita à ação de várias condições ambientais.

Os trabalhos de GAINNEY (1923) e GAINNEY e FOWLER (1949) mostram que o desenvolvimento de *Azotobacter* está estreitamente relacionado com o pH dos solos. CURIE (1931), BECK (1935) e SWABY (1939) não encontraram essa bactéria em solos ácidos, com pH inferior a 6,0. O seu desenvolvimento está ainda sujeito à influência, se bem que menor, de outros fatores. Assim, MARTIN, WALKER e BROWN (1937) e GAINNEY (1949) relacionam a presença de *Azotobacter* com o fósforo disponível no solo; BURK e LINEWEAVER (1930) e WILSON e WILSON (1933) relacionam *Azotobacter* e teor em

(*) — Trabalho parcialmente subvencionado pelo Conselho Nacional de Pesquisas.

nitrogênio; MULDER (1948) atribui ao molibdênio grande influência no desenvolvimento de *Azotobacter*; PETERSON e GOODING (1941) encontraram certa relação entre presença dessa bactéria e capacidade total de trocas dos solos examinados; GONICK e REUSZER (1948) e McKNIGHT (1949) atribuíram à umidade do solo alguma influência sobre a população aeróbica fixadora de nitrogênio.

Desde o isolamento e classificação de *Azotobacter chroococcum* por BELJERINCK (1901), tem surgido grande número de trabalhos concernentes à ocorrência e distribuição desse microorganismo, em várias partes do mundo. No Brasil, entre tanto, a literatura a isso referente é bastante escassa. O assunto mereceu a atenção de PERRIER (1927) que, usando a solução de Beijerinck como meio de cultura, notou a presença dessa bactéria fixadora de nitrogênio em alguns solos de Campinas, S. P., e do Paraná. DOBEREINER (1953), fazendo uso das técnicas de solução nutritiva e de placas de sílica-gel, relata a ocorrência da mesma espécie em solos ácidos da Baixada Fluminense, no Estado do Rio de Janeiro, nos quais o desenvolvimento de *Azotobacter* parece não depender unicamente do pH dos solos. Mais recentemente, ainda DOBEREINER (1955) acusa a presença generalizada de *Azotobacter indicum* (*Beijerinckia* sp.) em solos do Estado do Rio de Janeiro.

O presente trabalho relata o resultado do exame quantitativo de 71 solos, feito com o objetivo de se saber algo acerca da ocorrência e distribuição de *A. chroococcum* nos diversos tipos de solos examinados, bem como sobre alguns dos fatores que influenciam o desenvolvimento dessa bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Solos examinados. Foram examinadas 71 amostras de solos pertencentes aos terrenos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e da Usina Monte Alegre, em Piracicaba, S. P. As amostras incluíram solos argilosos (terra roxa), solos argilo-silicosos (terra roxa misturada) e diversos tipos de solos arenosos, e foram colhidas no período compreendido entre 6 de junho de 1952 e 21 de janeiro de 1953.

Amostragem. As amostras foram obtidas segundo as recomendações de WAKSMAN (1932). Para sua obtenção, raspava-se a camada superficial do solo, com o auxílio de um pequeno enxadão; em seguida fazia-se um buraco de cerca de 20 cm de profundidade, tomando-se o cuidado de manter uma de suas paredes na vertical. Com uma espátula de ferro previamente

flambada, retirava-se uma camada de solo da parede vertical que era eliminada. Em seguida retirava-se outra camada, até cerca de 15 cm de profundidade, que era colocada em uma lata com tampa, previamente esterilizada em estufa a 160°C durante duas horas. Repetia-se a operação em 4 ou 5 lugares dentro de um raio de 2 metros, para a obtenção de uma amostra. As latas eram a seguir fechadas e levadas para o laboratório.

Marcha dos ensaios. Os exames das amostras foram feitos sempre no mesmo dia da sua obtenção, salvo naqueles casos em que elas se mostravam com umidade excessiva, a ponto de dificultar o seu manuseio. Então elas eram expostas ao ar, em cubas de vidro abertas, durante a noite, procedendo-se ao seu exame no dia seguinte. Tôdas as amostras foram homogeneizadas e passadas em peneira de malha de 1 mm, depois do que se procedeu às diversas determinações.

Métodos de cultura. Foi feita uma revisão dos vários métodos culturais empregados na determinação de *Azotobacter* em solos. Seis diferentes amostras de solos foram analisadas simultaneamente com a solução de BEIJERINCK (1901), placas de solo de Winogradsky, segundo o usado por PETERSON e GOODING (1941), manitol-agar de CURIE (1931), manitol-agar de SWABY (1939) e dextrina-agar de Jensen, usada por McKNIGHT (1949). Tendo em vista os resultados obtidos nesse estudo preliminar, GALLI (1955), optou-se pelo método de Curie para a determinação do número de colônias, e pelo método de Swaby para a contagem do número de células por grama de solo. Em ambos os casos foram feitas 4 repetições para cada amostra examinada. As caixas foram incubadas em estufa a 28°C; tôdas as contagens foram feitas depois de 48 horas de incubação.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com o exame dos 71 solos estão apresentados na tabela I, em ordem decrescente de número de colônias de *Azotobacter* por grama de solo. 34 dos 71 solos examinados, ou 48%, deram resultado positivo quanto à presença da bactéria. A única espécie encontrada com os métodos empregados no presente trabalho foi *A. chroococcum*, que se caracterizou pela formação, sobre a superfície do meio de cultura, de colônias circulares, convexas, de bordos bem delimitados, translúcidas a princípio, mas adquirindo coloração pardo-chocolate após alguns dias de incubação. A caracterização morfo-

lógica feita ao microscópio, bem como reações fisiológicas não deixaram dúvidas quanto à identidade da espécie.

O exame dos dados referentes à umidade não mostra nenhuma relação aparente entre umidade do solo e presença da bactéria. McKNIGHT (1949) encontrou menor porcentagem de determinações positivas quando a umidade do solo era menor que 10%, porém não achou evidência de qualquer variação significativa na porcentagem de determinações positivas em solos com umidade superior a 10%. Por outro lado, GONICK e REUSZER (1948) encontraram maior porcentagem e população mais densa de *Azotobacter* em solos irrigados que nos não irrigados.

A proporção entre o número de colônias e o número de células por grama de solo, confirma resultados preliminares obtidos pelo autor, GALLI (1955), e indica que *Azotobacter* vive nos solos em colônias constituídas por um número bastante pequeno de células.

Tabela I — Distribuição de *Azotobacter* em solos de Piracicaba

Amostra	Tipo de solo (1)	pH	Umidade %	N. de <i>Azotobacter</i> por grama (2)	
				N. de col.	N. de cél.
1	R	6,92	11,0	495	640
2	M	7,60	15,6	471	605
3	R	7,82	21,9	445	721
4	R	6,34	12,0	445	1845
5	M	6,74	11,4	355	988
6	M	7,02	13,8	320	478
7	R	7,52	16,5	309	920
8	R	6,48	14,3	301	760
9	M	6,38	12,8	278	461
10	R	7,02	10,0	269	289
11	R	7,02	17,0	229	233
12	R	6,84	13,0	212	327
13	R	6,35	8,1	150	452
14	R	6,66	15,0	135	155
15	R	6,24	12,4	114	241
16	R	7,24	18,2	84	101
17	R	6,70	14,0	72	70
18	R	6,30	6,5	71	80
19	A	6,24	5,2	66	285
20	R	6,86	18,2	58	128
21	M	6,14	13,0	55	230
22	A	6,10	6,4	34	123
23	A	6,11	14,1	26	35
24	R	6,32	16,5	17	20

(Continua)

25	A	6,04	6,6	17	0
26	R	6,12	14,2	16	122
27	R	7,74	10,0	15	30
28	R	6,46	13,7	12	0
29	M	6,62	10,8	9	17
30	R	6,30	14,0	6	0
31	M	6,50	12,5	5	19
32	R	6,86	10,2	3	0
33	R	6,26	19,6	2	0
34	R	5,70	16,9	1	6
35	R	5,42	11,0	0	0
36	R	5,86	13,2	0	0
37	R	6,10	12,0	0	0
38	R	5,72	11,5	0	0
39	R	5,36	12,2	0	0
40	A	5,40	10,4	0	0
41	A	5,16	7,1	0	0
42	A	5,84	10,6	0	0
43	A	5,08	10,8	0	0
44	A	5,32	9,7	0	0
45	R	5,97	11,1	0	0
46	A	5,88	13,5	0	0
47	M	6,04	11,0	0	0
48	M	5,26	13,5	0	0
49	A	5,02	12,4	0	0
50	M	5,82	12,5	0	0
51	A	5,48	12,7	0	0
52	R	6,00	19,5	0	0
53	A	5,66	12,3	0	0
54	R	5,90	16,9	0	0
55	R	5,96	19,5	0	0
56	R	5,64	11,1	0	0
57	R	5,72	13,0	0	0
58	R	5,62	13,6	0	0
59	R	6,22	12,7	0	0
60	R	6,28	11,1	0	0
61	R	6,06	12,3	0	0
62	R	5,87	11,4	0	0
63	A	5,84	15,5	0	0
64	A	6,54	15,3	0	0
65	A	6,72	16,2	0	0
66	A	6,40	14,8	0	0
67	A	4,75	14,6	0	0
68	A	4,67	16,4	0	0
69	A	5,98	15,3	0	0
70	A	5,82	10,0	0	0
71	M	6,84	10,9	0	0

(1) R = solos argilosos; M = solos sílico-argilosos; A = solos arenosos.

(2) média de quatro repetições

A densidade da população aeróbica fixadora de nitrogênio nos solos examinados não é grande, 13 dos 34 solos nos quais a bactéria se mostrou presente, apresentaram entre 1 e 100 células por grama, 21 deles apresentaram entre 100 e 1000 células por gramas e 1 atingiu a casa dos milhares. Conquanto esses resultados concordem com os apresentados por WINOGRADSKY (1926), CURIE (1931) e SWABY (1939), são superiores aos obtidos por VANDECAVEYE e ANDERSON (1934), BECK (1935) e GONICK e REUSZER (1948). CAMARGO (1954) dá a seguinte população média de microorganismos para solos de terrenos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz":

Solos arenosos	2.000.000 por grama
Solos argilosos	20.000.000 por grama

Comparando-se esses dados com os números de colônias ou de células de *Azotobacter* constantes na tabela I, vê-se que este microorganismo não é muito numeroso, constituindo uma parte muito pequena do número total de microorganismos do solo.

O pH dos solos examinados variou entre 4,67 e 7,82. Os resultados mostram haver estreita relação entre pH do solo e presença de *Azotobacter*. A tabela II mostra que *Azotobacter* ocorre mais frequentemente nos solos com pH mais elevado.

Somente um dos solos com pH inferior a 6,04 acusou a presença da bactéria. Por outro lado, ela mostrou-se presente em 33 dos 42 solos com pH igual ou superior áquele. Esses resultados estão concordes com outros encontrados na literatura. GAINEY (1923) achou uma relação bastante estreita entre reação do solo e presença de *Azotobacter*, e atribuiu a ausência desse grupo de bactérias nos solos em exame a um efeito tóxico da alta concentração de ions H dos mesmos. McKNIGHT (1949) encontrou maior frequência de *Azotobacter* em solos com pH superior a 5,9, e atribuiu a esse fator uma influência primordial na ocorrência dessa bactéria. VANDECAVEYE e ANDERSON (1934) e GAINEY (1949) não conseguiram estabelecer uma flora de *Azotobacter* em solos ácidos inoculados com a bactéria, mesmo quando os solos inoculados eram previamente tratados com superfosfato. Além desses, outros investigadores, entre eles CURIE (1931), BECK (1935), MARTIN et al. (1937) e SWABY (1939), chegaram a resultados idênticos, mostrando que solos ácidos, com pH inferior a 6,0,

não oferecem condições muito favoráveis para o desenvolvimento dessa bactéria fixadora de nitrogênio.

Por outro lado, encontram-se várias referências acerca da ocorrência de *Azotobacter* em solos ácidos. WILSON e WILSON (1933) trabalhando com solos turfosos, e PETERSON e GOODING (1941), não acharam relação direta entre pH dos solos e presença de *Azotobacter*. Isso, entretanto, pode encontrar explicação nos trabalhos de BURK e LINEWEAVER (1930) e BURK et al. (1934), que mostraram que *A. chroococcum* pode sobreviver em meio com pH inferior a 6,0, quando dispondo de nitrogênio combinado necessário ao seu metabolismo. Nessas condições, todavia, não ocorre fixação do nitrogênio elementar, que somente se verifica em meio com pH superior àquele limite.

Os resultados relatados no presente trabalho discordam dos obtidos por DOBEREINER (1953) que, examinando solos da Baixada Fluminense, no estado do Rio de Janeiro, acusou a presença dessa bactéria em solos com pH 4,6. Também não foi constatada a ocorrência de *A. indicum* (*Beijerinckia* sp.) que, segundo DOBEREINER (1955) é de distribuição generalizada em solos daquele estado.

A tabela II mostra que a frequência de determinações positivas cresceu com o aumento do pH dos solos, a partir de 5,7. Todos os solos com pH superior a 6,90 acusaram a presença da bactéria.

O número médio de colônias, ou seja, a densidade da população dessa bactéria, também foi afetado pela concentração de ions H, tendo aumentado com o aumento do pH até um máximo, nos solos com pH entre 6,90 e 7,29, decrescendo depois.

A tabela III apresenta os resultados relativos aos solos com pH superior a 6,0, agrupados segundo os três tipos gerais de solos examinados. As terras roxas apresentaram maior proporção de casos positivos, seguidas das terras roxas misturadas e, por último, das terras arenosas.

Infelizmente não dispomos de dados referentes ao grau de fertilidade de cada um dos solos usados no presente trabalho. Mas de um modo geral, podemos considerar as terras roxas como sendo mais férteis que as terras roxas misturadas, e estas mais que os solos arenosos. Assim sendo, a distribuição de *Azotobacter* mostrou manter relação com o grau de fertilidade dos solos, ocorrendo em maior proporção nos solos de fertilidade mais elevada.

Tabela II — Relação entre pH do solo e ocorrência de *Azotobacter*

pH	Num. de amostra	Amostras com <i>Azotobacter</i>		Número médio de colônias por amostras
		n.	%	
— de 5,70	17	0	0	0
5,70 — 5,99	11	1	9,1	1
6,00 — 6,29	14	8	57,1	41,2
6,30 — 6,59	11	9	82,0	143,1
6,60 — 6,89	9	7	77,7	120,5
6,90 — 7,19	4	4	100,0	328,2
+ de 7,20	5	5	100,0	264,8

Tabela III — Distribuição de *Azotobacter* de acôrdo com os tipos de solo

Tipo de solo	Total de amost. (1)	Amostras com <i>Azotobacter</i>	
		n.	%
Solos argilosos	28	23	82,1
Solos argilo-silicosos	9	7	77,7
Solos silicosos	7	4	57,1

(1) Amostras com pH superior a 6,00

RESUMO E CONCLUSÕES

Foram feitas determinações quantitativas de *Azotobacter chroococcum* em 71 solos pertencentes aos terrenos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e da Usina Monte Alegre, em Piracicaba, S. P.

Os solos examinados incluíram solos argilosos (terra roxa), solos argilo-silicosos (terra roxa misturada) e solos arenosos.

Foi empregado o método de Curie para a determinação do número de colônias, e o de Swaby para a contagem do número de células da bactéria por grama de solo.

Dos resultados obtidos, pode-se tirar as conclusões seguintes:

48% dos solos examinados deram resultado positivo quanto à presença de *A. chroococcum*, que foi a única espécie encontrada com os métodos empregados no presente trabalho.

A densidade da população de *Azotobacter* não é grande, situando-se na casa das dezenas e das centenas de indivíduos por grama de solo. As colônias da bactéria no solo são constituídas por um número muito pequeno de células.

Houve uma relação bastante estreita entre pH dos solos e presença de *Azotobacter*. A reação do solo mostrou ser o fator primordial na ocorrência da bactéria nos solos examinados. O pH influenciou também na densidade da população dessa bactéria nos mesmos solos.

Não foi encontrada nenhuma relação entre umidade do solo e presença ou desenvolvimento de *Azotobacter*.

Os tipos de solos de maior fertilidade mostraram maior porcentagem de determinações positivas; a bactéria foi encontrada mais frequentemente nas terras roxas, seguidas das terras roxas misturadas e, por último, dos solos arenosos.

SUMMARY

71 soils distributed in the areas of the Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" and the Usina Monte Alegre, at Piracicaba, S. P., Brazil, were examined for the presence of *Azotobacter*.

The soils belonged to one of the following types: heavy clay soil (terra roxa), clay sandy soils (terra roxa misturada) and some sandy soils.

The presence of *Azotobacter* was determined in these soils by the Curie's plate method for colonies count and by the Swaby's method for single cells count.

The following conclusions can be drawn:

— 48 per cent of the soils contained *Azotobacter*. *A. chroococcum* was the only species found to be present in these soils.

— *Azotobacter* population was not very dense in these soils. 13 soils had between 1 and 100 cells per gram, and 21 soils had more than 100 cells. The colonies of this microorganism in the soil were constituted by small amount of cells.

— The pH of the soil was the major factor governing the occurrence of *Azotobacter*. No *Azotobacter* was found in soil with pH less than 5.7. The pH also had influence on the number of colonies of *Azotobacter* per gram.

— No relation was shown between soil moisture and presence of the organism.

— Greater number of positive determinations was found in soils with greater fertility. *Azotobacter* was most frequent in clay soils (terra roxa), then in clay sandy soils and then in sandy soils.

LITERATURA CITADA

BECK, A. B., 1935 — Notes on the occurrence of *Azotobacter* in some South Australian soils. *Aust. Jour. Exp. Biol.* 13 : 127-131.

BEIJERINCK, M. W., 1901 — Ueber oligonitrophile mikroben. *Centralbl. fur Bakt. etc.*, II Abst. 7 : 561-582.

BURK, D. e H. LINEWEAVER, 1930 — The influence of fixed nitrogen on *Azotobacter*. *J. Bact.* 19 : 389-414.

BURK, D., H. LINEWEAVER e C. K. HORNER, 1934 — The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Bact.* 27 : 325-341.

CAMARGO, R., 1954 — O desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça. *Bol. Instituto Zimotécnico (Piracicaba)* 9, 44 p.

CURIE, I. H., 1931 — A method for the study of *Azotobacter* and its application to fertility plot soils. *Soil Sci.* 32: 9-25.

DOBEREINER, JOHANNA, 1953 — *Azotobacter* em solos ácidos. *Bol. Inst. Ecologia e Exp. Agrícola* 11, 31 p.

DOBEREINER, JOHANNA, 1955 — Comunicação particular.

GAINNEY, P. L., 1923 — Influence of absolute reaction of a soil upon its *Azotobacter* flora and nitrogen fixing ability. *Jour. Agric. Res.* 24 : 907-938.

GAINNEY, P. L., 1949 — Effect of inoculating a soil with *Azotobacter* upon plant growth and nitrogen balance. *Jour. Agric. Res.* 78 : 405-411.

- GAINEY, P. L. e E. FOWLER, 1945 — Growth curves of *Azotobacter* at different pH levels. *Jour. Agric. Res.* 70: 219-236.
- GALLI, F., 1955 — Métodos para a determinação da presença de *Azotobacter chroococcum* no solo. *Rev. Agric.* (Piracicaba) 30 : 163-172.
- GONICK, W. N., e H. W. REUSZER, 1948 — The distribution of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii* in Colorado soils and surface waters. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* 13 : 251-257.
- MARTIN, W. P., R. H. WALKER e P. E. BROWN, 1937 — The occurrence of *Azotobacter* in Iowa soils and factors affecting their distribution. *Iowa Sta. Col. Agric. Sta. Res. Bul.* 217 : 225-256.
- MCKNIGHT, T., 1949 — Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms in Queensland soils. *Queensland Jour. Agric. Sci.* 6: 177-195.
- MULDER, E. G., 1948 — Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of microorganisms and higher plants. *Plant & Soil* 1 : 94-119.
- PERRIER, A. 1927 — O *Azotobacter chroococcum* e a prova biológica da reação do solo. Relatório do Inst. Agrônômico do Estado de S. Paulo, 1926 : 37-64.
- PETERSON, H. B. e T. H. GOODING, 1941 — The geographic distribution of *Azotobacter* and *Rhizobium meliloti* in Nebraska soils in relation to certain environmental factors. *Univ. of Nebraska Agric. Exp. Sta. Res. Bul.* 121, 24 p.
- SWABY, R. J., 1939 — The occurrence and activities of *Azotobacter* and *Clostridium butyricum* in Victorian soils. *Aust. Jour. Exp. Biol.* 17 : 401-423.
- WAKSMAN, S. A., 1932 — Principles of soil microbiology. Baltimore, The Willians & Wilkins Co., 2a. ed., 894 p.