

REVISTA DE AGRICULTURA

Caixa Postal 60
13400 Piracicaba
Estado de São Paulo
Brasil

Diretores:

Prof.Dr. F. Pimentel Gomes
Prof.Dr. Luiz Gonzaga E. Lordello

Conselho Editorial:

Prof.Dr. Evôneo Berti Filho
Prof.Dr. Hilton T. Zarate do Couto
Prof.^aDr.^a Marli de Bem Gomes

Vol. 65

SETEMBRO/1990

N.º 3

**LEVANTAMENTO QUANTITATIVO DE BACTÉRIAS FIXADORAS
DE N₂ EM SOLO SOB DIFERENTES ECOSSISTEMAS
DE PASTAGEM**

M.J. Valarini¹
J.J.A.A. Demarchi²
E.A. Veasey¹
J.A. Santos²

INTRODUÇÃO

O estudo da fixação biológica de nitrogênio associada a pastagens, leguminosas e gramíneas, torna-se importante na definição das características das plantas e estruturas de pastos produtivos e persistentes com pouca ou nenhuma adição de formas químicas de nitrogênio (SCOTTI *et alii*, 1989). Leguminosas forrageiras fixam nitrogênio atmosférico, podendo transferir esse nutriente para a gramínea em pastagens consorciadas (BROPHY *et alii*, 1987; TA & FARIS, 1987). A quantidade de N transferida pode variar com a composição botânica da mistura (HEICHEL, 1989; LEDGARD, 1989). Quanto à sobrevivência

¹ Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP.

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP.

de microorganismos no solo, a mesma pode ser afetada por uma variedade de fatores bióticos e abióticos (PENA-CABRIALES & ALEXANDER, 1983; BROMFIELD *et alii*, 1986). Sob condições naturais, o meio provável pelo qual esses organismos aumentam significativamente em abundância está associado com excreções de raízes de plantas (PENA-CABRIALES & ALEXANDER, 1983). A capacidade de utilização desses compostos orgânicos constitui, geralmente, uma vantagem competitiva no solo (GERMIDA, 1988); mais de 50% das bactérias aeróbicas do solo requerem vitaminas como fator de crescimento. Quanto à fixação simbiótica, sugere-se que a planta hospedeira possa exercer uma seleção preferencial para populações de rizóbios capazes de nodulá-la eficiente ou ineficientemente (AMARGER, 1981). Por outro lado, o fenômeno da interação de microorganismos com raízes de plantas da família Gramineae tem sido também comprovada (DOBEREINER *et alii*, 1972; SCOTTI *et alii*, 1989). Assim, o presente trabalho objetivou analisar, de forma quantitativa, a presença de bactérias fixadoras de N em solos sob diferentes ecossistemas de pastagens.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em Nova Odessa, com solo Podzólico Vermelho-Amarelo var. Laras sob as coberturas vegetais de *Macrotyloma axillare*, *Panicum maximum* e *M. axillare* + *P. maximum*, estabelecidas há 15 anos. As amostras de solo analisadas foram retiradas nas profundidades de 15 e 35 cm, em diferentes pontos da pastagem, formando-se assim uma amostra composta. Os fixadores simbióticos de N₂ (*Bradyrhizobium*) foram quantificados através de diluições em série da solução do solo, pelo método NMP (DATE & VINCENT, 1962) em vaso de LEONARD modificado, composto de solução nutritiva (NORRIS & DATE, 1976), vermiculita e areia esterilizadas. Como leguminosas testadoras de nodulação, foram utilizadas *M. axillare* e *Macroptilium atropurpureum*, em casa de vegetação. As bactérias fixadoras de N₂ livres foram avaliadas através de diluição em série e plaqueamento em meio LG

(GRACIOLLI, 1982) isento de nitrogênio, pelo método "pour plate" e incubação a 28°C por 7 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos resultados em termos de reação de nodulação e estimativa do número de células em função da cobertura vegetal e umidade do solo, profundidade e diluição da solução do solo (Quadros 1 e 2) e os valores de contagem de bactérias totais desenvolvidas em meio isento de nitrogênio (LG) (Quadro 3). Assumindo que uma única célula de rizóbio é capaz de multiplicar e nodular a raiz, o número mais provável (NMP) de rizóbios pode ser determinado por tabelas estatísticas e correlacionado à quantidade da amostra original (DATE & VINCENT, 1962; BROCKWELL *et alii*, 1975). Assim, como observado pelos dados (Quadros 1 e 2), os resultados mostraram nodulação positiva para ambas as leguminosas utilizadas até a diluição 10^{-4} com um número maior de casos positivos para *M. axillare*, principalmente onde a cobertura vegetal também era essa leguminosa exclusiva ou associada. De fato, AMARGER (1981) sugeriu que a planta hospedeira pode exercer seleção preferencial para populações de rizóbios capazes de nodulá-la, eficiente ou ineficientemente. Nesse contexto, vários trabalhos têm demonstrado a vantagem competitiva da população nativa de *Rhizobium* estabelecida há vários anos (RENSBURG & STRIDJON, 1985), sendo mesmo detectada em solos ausentes de leguminosas por até 40 anos (GERMIDA, 1988). Tais observações estão, na prática, relacionadas com o sucesso na introdução de estirpes inoculantes, enfatizando a importância de informações quanto à distribuição, dinâmica de populações e ecologia de bactérias da família Rhizobiaceae (GERMIDA, 1988). O efeito de profundidade pode ser confundido nesse trabalho com o efeito de umidade do solo, sugerindo que em solos secos a semeadura deva ser mais profunda. Quanto às bactérias desenvolvidas em meio isento de nitrogênio, observa-se (Quadro 3) um valor significativamente maior para a amostra retirada de rizosfera de *P. maximum* (colônias) na profundidade

sociativa entre bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Beijerinckia* com gramíneas tropicais que apresentam a via fotosintética C₄, tem sido frequentemente referido na literatura (DOBEREINER, 1974; SPRENT, 1979). Assim, sugere-se que tal associação promova troca de substâncias excretadas por ambos, podendo ser aproveitadas de forma independente. Especificamente com *Panicum*, RUSCHEL & BRITTO (1966) observaram a presença de grande número de bactérias do gênero *Beijerinckia* desenvolvendo-se na rizosfera do referido capim. A importância da fixação associativa de N₂ vem sendo cada vez mais enfatizada.

Quadro 1 - Reação de nodulação e concentração estimada de rizóbios em função da diluição do solo, cobertura vegetal e profundidade para *Macrotyloma atropurpureum* (siratro).

COBERTURA VEGETAL						
DILUIÇÃO	<i>Macrotyloma axillare</i>		<i>M. axillare</i> + <i>P. maximum</i>		<i>Panicum maximum</i>	
	15 ⁽¹⁾ (6,7) ⁽²⁾	35 (8,0)	15 (8,9)	35 (11,0)	15 (4,1)	35 (9,2)
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	-	+	-	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-
Conc. ⁽³⁾ estimada	1,82 _x x10 ²	1,97 _x x10 ⁴	1,86 _x x10 ²	1,91 _x x10 ²	1,77 _x x10 ²	1,82 _x x10 ²

(1) Profundidade do solo (cm);

(2) Umidade do solo (%);

(3) Concentração estimada (cels/g solo seco), segundo DATE & VINCENT (1962);

+ nodulação positiva;

- nodulação negativa.

Quadro 2 - Reação de nodulação e concentração estimada de rizóbios em função da diluição do solo, cobertura vegetal e profundidade para *Macrotyloma axillare*.

COBERTURA VEGETAL						
DILUIÇÃO	<i>Macrotyloma axillare</i>		<i>M. axillare</i> + <i>P. maximum</i>		<i>Panicum maximum</i>	
	15 ⁽¹⁾ (6,7) ⁽²⁾	35 (8,0)	15 (8,9)	35 (11,0)	15 (4,1)	35 (9,2)
10 ⁻²	+	+	+	+	+	-
10 ⁻⁴	+	+	+	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-
Conc. ⁽³⁾ estimada	1,92 _x x10 ⁴	1,97 _x x10 ⁴	1,97 _x x10 ⁴	1,91 _x x10 ²	1,77 _x x10 ²	1,87 _x x10 ²

(1) Profundidade do solo (cm);

(2) Umidade do solo (%);

(3) Concentração estimada (cels/g solo seco), segundo DATE & VINCENT (1962);

+ nodulação positiva;

- nodulação negativa.

Quadro 3 - Valores médios de contagem de bactérias totais desenvolvidas em meio isento de nitrogênio em função da cobertura vegetal e profundidade do solo.

COBERTURA VEGETAL	CONTAGEM x 10 ⁷ cels./g SOLO SECO	
	15 ⁽¹⁾	35
<i>Macrotyloma axillare</i>	44,79	67,90
<i>M. axillare</i> + <i>P. maximum</i>	56,61	82,88
<i>Panicum maximum</i>	23,57	315,60

(1) Profundidade do solo (cm).

CONCLUSÕES

1. A cobertura vegetal estabelecida ao longo do tempo pode exercer pressão seletiva na população de bactérias fixadoras de N_2 do solo associada ou não às raízes; 2. Leguminosa exlú²siva ou associada tende a manter níveis mais altos da população de rizóbio que gramínea; 3. Gramínea exclusiva tende a manter níveis mais altos da população de bactérias fixadoras de N_2 livres que leguminosa; 4. A umidade do solo pode intêrferir no número de bactérias fixadoras de N_2 pelo menos em solo Podzólico Vermelho-Amarelo var. Lañas.

RESUMO

A cobertura vegetal de um solo pode atuar como agente seletivo de populações, discriminando grupos fisiológicos e/ou nutricionais de microorganismos segundo a liberação ou exsudação de compostos orgânicos. Assim, amostras de solo Podzólico Vermelho-Amarelo var. Laras cultivado com *Macrotyloma axillare*, *Panicum maximum*, *M. axillare* + *P. maximum*, com 15 anos de estabelecimento, foram analisadas nas profundidades 15 e 35 cm. Os grupos fisiológicos de microorganismos analisados incluíram fixadores simbióticos de nitrogênio (*Bradyrhizobium*) quantificados pelo método do número mais provável (NMP) de nodulação em *M. axillare* e *Macroptilium atropurpureum*, e fixadores livres em meio LG, pelo método "pour plate". Os resultados mostraram variações quantitativas nas populações de *Bradyrhizobium* de acordo com a cobertura vegetal. Observaram-se da ordem de 10^4 cels. de *Bradyrhizobium*/g de solo nodulante de *M. axillare*, onde as coberturas vegetais eram *M. axillare* exclusiva e *M. axillare* + *P. maximum*. Em geral, para *M. atropurpureum*, uma leguminosa de baixa especificidade, verificou-se a presença da ordem de 10^2 cels./g de solo. O baixo percentual de umidade do solo concorreu para um menor número de células viáveis de *Bradyrhizobium*, uma vez que na profundidade de 35 cm, onde a umidade era maior, observou-se nodulação mais intensa para todos os casos. Com

relação aos fixadores livres, foi observado um maior número de células na profundidade de 35 cm do solo sob *P. maximum* ($> 10^8$ cels./g de solo). Tais resultados ratificam que, sob condições naturais, os organismos aumentam seletivamente em abundância em função da excreção de raízes.

SUMMARY

The organic coverage of soil may act as a selective agent for populations discriminating physiological and/or nutritional groups of microorganisms, according to the release or exudation of organic compounds. Samples of a Podzolic Red-Yellow var. Laras soil cultivated with *M. axillare*, *Panicum maximum* and *M. axillare* + *P. maximum*, for 15 years, were analysed at the depths of 15 and 35 cm. The physiological groups of microorganisms evaluated included symbiotic nitrogen-fixing organisms (*Bradyrhizobium*), determined by the most probable number (MPN) of the plant dilution method of nodulation in *M. axillare* and *Macroptilium atropurpureum*, and the free fixing organisms in LG medium, by the pour plate method. The results showed quantitative variations in the *Bradyrhizobium* populations according to the organic coverage. Also 10^4 *Bradyrhizobium* cells/g soil associated to *M. axillare* were observed, where *M. axillare* alone and *M. axillare* + *P. maximum* were the organic coverages. In general, for *M. atropurpureum*, a low specificity host, 10 rhizobia cells/g soil were observed. The low percentage of soil humidity should be responsible for the low number of viable *Bradyrhizobium* cells and for the nodulation at the depth of 35 cm. A higher number of cells ($> 10^8$ cells/g) at the depth of 35 cm of soil under *P. maximum* was observed for the free-fixing microorganisms. These results confirm that, under natural conditions, the microorganisms increase selectively in abundance according to the root exudates.

LITERATURA CITADA

- AMARGER, N., 1981. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.*, 13: 475-480.
- BROCKWELL, J., A. DIATLOFF, A. GRASSIA, C. ROBINSON, 1975. Use of mild soybean (*Glycine ussuriensis* REGEL and MAACK) as a test plant in dilution-nodulation frequency tests for counting *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.*, 7: 305-11.
- BROMFIELD, E.S.P., I.B. SINHA & M.S. WOLYNETZ, 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1077-1084.
- BROPHY, L.S., G.H. HEICHEL, M.P. RUSSELLE, 1987. Nitrogen transfer from forage legumes to grass in a systematic planting design. *Crop Sci.*, 27: 753-758.
- DATE, R.A. & J.M. VINCENT, 1962. Determination of the number of root-nodule bacteria in the presence of other organisms. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 28: 5-9.
- DOBEREINER, J., 1974. Nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere. In: QUINSPEL, A. (ed.) *The biology of nitrogen fixation*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 86-120.
- DOBEREINER, J., J.M. DAY & P.J. DART, 1972. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some tropical grasses. *Plant and Soil*, 37: 191-196.
- GERMIDA, J.J., 1988. Growth of indigenous *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti* in soils amended with organic nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 257-263.

- GRACIOLLI, L.A., 1982. Bactérias fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ, 49p. (Dissertação de Mestrado).
- HEICKEL, G.H., 1989. Dinitrogen fixation and nitrogen transfer in temperate legume-grass communities. In: Proceed. of XVI Intern. Grassl. Congr., Nice. p.131-132.
- LEDGARD, S.F., 1989. Nitrogen fixation and transfer to associated grasses by white clover cultivars under dairy cow grazing. In: Proceed. of XVI Intern. Grassl. Congr., Nice. p.169-170.
- NORRIS, D.O. & R.A. DATE, 1976. Legume bacteriology. In: **Tropical Pasture Research Principles and Methods**. Slogh, Common. Bur. Pastures and Fields Crops. p.134-174 (CAB Bul., 51).
- PENA-CABRIALES, J.J. & M. ALEXANDER, 1983. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 47: 241-245.
- RENSBURG, H.J. & B.W. STRIJDON, 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49: 127-131.
- RUSCHEL, A.P. & D.P.P.S. BRITTO, 1966. Fixação assimilatória de nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* DERX. **Pesq. Agrop. Bras.**, 1: 65-69.
- SCOTTI, C., L. ZANNONE & M.MOLINARI, 1989. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation in grasses and binary associations lucern + grass. In: Proceed. of XVI Intern. Grassl. Congr., Nice. p.139-140.
- SPRENT, J.I., 1979. **The biology of nitrogen fixing organisms**. London, McGraw-Hill Book Company Limited. 196p.

TA, T.C. & M.A. FARIS, 1987. Effects of alfalfa proportions and clipping frequencies in timothy-alfalfa mixtures. II. Nitrogen fixation and transfer. *Agron. J.*, 79: 820-824.