

MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE *Azotobacter chroococcum* NO SOLO

FERDINANDO GALLI

Assistente de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola

E. S. A. "Luiz de Queiroz" — U. S. P.

1 — INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Azotobacter*, das quais a espécie *A. chroococcum* Beijerinck é a mais comum, são geralmente consideradas como sendo os mais importantes agentes da fixação não simbiótica do nitrogênio atmosférico. Por êsse motivo, a determinação da ocorrência desses microorganismos nos solos tem sido preocupação constante de grande número de investigadores. Uma revisão da literatura referente ao assunto mostra que são inúmeros os métodos usados para tal fim. De um modo geral, a presença de *Azotobacter* pode ser demonstrada das maneiras seguintes: a) por meio de métodos qualitativos, que indicam apenas a presença ou ausência da bactéria no solo em exame; para isso são geralmente usadas as soluções nutritivas de Beijerinck (1), de Ashby, de Omeliansky e outras (8), e as placas de solo de Winogradsky (9) ou alguma de suas modificações (6); no primeiro caso, o crescimento da bactéria no meio líquido, desprovido de nitrogênio combinado, acusa a sua presença no solo usado como inóculo. No segundo caso, a adição de um hidrato de carbono, sais minerais, e água até um ótimo de umidade, ao solo em exame, cria condições que provocam o desenvolvimento das colônias de *Azotobacter* por ventura existentes no solo. b) por métodos quantitativos, que dão,

em números, a população fixadora aeróbica não simbiótica de nitrogênio. Neste sentido, dois são os pontos de interesse: o número de colônias da bactéria por grama de solo, naqueles casos em que se provoca o desenvolvimento das colônias existentes nas partículas terrosas (2, 10), e o número de células de *Azotobacter*, obtido quando se produz a desagregação das colônias desse microorganismo antes da inoculação do meio de cultura, de modo que as células se desenvolvam isoladamente na superfície do meio de cultura, dando origem a colônias distintas (5, 7).

O presente trabalho serviu de preâmbulo para um estudo da microflora fixadora de nitrogênio de alguns solos de Piracicaba. É um estudo comparativo de alguns métodos qualitativos e quantitativos por nós usados para analisar diferentes amostras de solo, feito com o fito de se saber das vantagens e inconveniências de cada um dos métodos empregados.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2.1 — Material: Foram utilizadas 16 amostras de solos pertencentes aos terrenos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", compreendendo solos argilosos (terra roxa), solos argilo-silicosos (terra roxa misturada) e solos arenosos. Os exames foram feitos sempre no mesmo dia da retirada das amostras, e todos os métodos descritos a seguir foram empregados simultaneamente. As caixas de Petri e os frascos Erlenmeyer, depois de preparados, foram incubados à temperatura de 28°C. De todos os métodos empregados, foram feitas 4 repetições. As determinações de umidade foram feitas por secagem em estufa a 100-105°C. durante 3-4 horas.

2.2 — Métodos. No presente trabalho foram empregados os métodos descritos a seguir:

2.2.1 — Métodos qualitativos:

2.2.1.1. — Solução de Beijerinck (1). Em frascos Erlenmeyer de 125 cc., colocava-se porções de 50 cc. da solução seguinte:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Manitol | 20 gr |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 gr |
| Água corrente | 1000 cc |

Cada frasco recebia ainda 0,5 gr de carbonato de cálcio. Os frascos foram esterilizados em autoclave, e a inoculação foi feita com cerca de 5 gr do solo a ser examinado. As culturas foram incubadas e mantidas em observação durante 30 dias, fazendo-se periódicamente, exames microscópicos das soluções.

2.2.1.2 — Placas de solo de Winogradsky, modificação de Peterson e Goodding (6). 50 gr de solo foram misturadas com 2,5 gr de amido, 0,3 gr de carbonato de cálcio e 5 cc. de uma solução contendo 6% de fosfato bipotássico e 0,05% de nitrato de amônio. Adicionou-se água contendo traços de molibdato de sódio em quantidade suficiente para se obter uma pasta, que foi depois, com auxílio de uma espátula, moldada em caixas de Petri de 10 cm de diâmetro, de tal modo a se obter uma superfície lisa e uniforme. As caixas foram a seguir incubadas em ambiente úmido.

2.2.2 — Métodos quantitativos :

2.2.2.1 — Sílica-gel de Winogradsky (8). 75 cc de uma solução normal de silicato de sódio foram misturados com igual quantidade de uma solução normal de ácido clorídrico, sendo a mistura agitada e em seguida vertida em caixas de Petri de 20 cm de diâmetro, que foram deixadas em repouso por 24 horas. Foram a seguir submetidas a lavagem em água corrente, por 48 horas, depois em água destilada, primeiramente a frio e por último a quente, até remoção completa dos cloretos. Preparava-se uma solução nutritiva constituída de :

| | |
|--------------------------------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 gr |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,3 gr |
| NaCl | 0,3 gr |
| FeSO ₄ | traços |
| MnSO ₄ | traços |
| Água destilada | 100 cc |

com pH corrigido a 7,3 - 7,5 com NaOH normal. Sôbre a superfície da sílica-gel verteu-se uma solução constituída de 8 cc da solução nutritiva acima descrita, 2 gr de manitol e 0,1 - 0,2 gr de carbonato de cálcio, previamente fervida, sendo as caixas, a seguir, levadas à estufa a 45-50°C. para evaporação do excesso de água. A inoculação foi feita com 1 grama de solo espalhado uniformemente sôbre a superfície da sílica-gel. Em seguida as caixas foram incubadas, sendo examinadas depois de 48 horas de incubação.

2.2.2.2 — Manitol-agar de Curie (2). Preparou-se um meio de cultura contendo 15 gr de agar e 15 gr de manitol por 1000 cc de água destilada, e 2 gr da mistura de sais seguinte :

| | |
|---|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 100 gr |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 60 gr |
| NaCl | 60 gr |
| Fe ₃ (SO ₄) ₂ | 1 gr |
| MnSO ₄ | 1 gr |
| CaCO ₃ | 178 gr |

Verteu-se porções de cêrca de 150 cc dêsse meio previamente liquefeito em autoclave, em caixas de Petri de 20 cm de diâmetro. Depois do resfriamento e consequente solidificação do meio de cultura, as caixas foram inoculadas como no método de Winogradsky, e incubadas a seguir.

2.2.2.3 — Método de Swaby (7). Porções de 10 cc do meio de Curie previamente derretido foram vertidas em caixas de Petri de 10 cm de diâmetro, que foram deixadas em repouso até solidificação do meio de cultura. Preparou-se uma suspensão de 1 gr de solo em 10 cc de água esterilizada, agitando-se durante 10 minutos. Inoculou-se cada caixa com 1 cc da suspensão de solo, e em seguida verteu-se mais 2 cc do meio de cultura liquefeito, agitando-se as caixas para misturar o meio de cultura com a suspensão. Dessa forma as partículas de solo ficaram distribuídas numa película de agar muito fina, sôbre o

meio de cultura. As caixas foram a seguir incubadas, e examinadas dois dias após.

2.2.2.4 — Método de Jensen, segundo o descrito por McKnight (5). O meio de cultura empregado neste método tinha a composição seguinte :

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Dextrina | 10 gr |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 gr |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 gr |
| FeCl ₃ | 0,05 gr |
| Na ₂ MoO ₄ | 0,025 gr |
| CaCO ₃ | 5 gr |
| Agar | 20 gr |
| Água destilada | 1000 cc |

Colocou-se uma camada desse meio em caixas de Petri de 10 cm de diâmetro, deixando-se esfriar, e pipetou-se sobre ela 0,4 cc de uma suspensão de 1 gr de solo em 10 cc de água esterilizada, espalhando-se a suspensão por sobre toda a superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma agulha de platina em alça, e deixando-se as caixas expostas ao ar até evaporação do excesso de água. Em seguida procedeu-se à incubação das mesmas.

3 — RESULTADOS

Os resultados obtidos com 6 solos que continham *Azotobacter* estão apresentados na tabela I. 10 outros solos deram resultado negativo quanto à presença dessa bactéria, e por isso não constam da tabela.

A sílica-gel de Winogradsky mostrou ser bastante adequada para o crescimento de *Azotobacter*, cujas colônias desenvolviam-se rapidamente, atingindo diâmetro variável de 2 a 5 mms após 72 horas de incubação. O meio mostrou ser bastante seletivo, impedindo quase por completo o desenvolvimento de ou-

tros microorganismos que não o *Azotobacter*. O meio de manitol-agar de Curie também deu resultados satisfatórios. As colônias desenvolviam-se tão bem quanto na sílica-gel. Outros microorganismos, apesar de se desenvolverem pouco melhor que no caso anterior, formavam ainda colônias pequenas e completamente distintas das colônias de *Azotobacter*, não interferindo com o exame e a contagem dessas últimas.

TABELA I — Distribuição de *Azotobacter chroococcum* em solos, de acordo com os métodos empregados (*)

| Amostra de solo | METODO USADO | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|---------|--------|---------------------|------------|
| | Curie1 | Winogradsky1 | Jensen2 | Swaby2 | Peterson e Gooding3 | Bejerinck3 |
| 1 | 495 | 528 | 305 | 640 | + | + |
| 2 | 309 | 316 | 784 | 920 | + | + |
| 3 | 301 | 293 | 273 | 760 | + | — |
| 4 | 135 | 107 | 99 | 150 | + | — |
| 5 | 72 | 123 | 123 | 70 | + | — |
| 6 | 15 | 15 | 14 | 30 | + | — |

(*) — média de 4 repetições

1 — número de colônias por grama de solo

2 — número de células por grama de solo

3 — (+) = frascos com crescimento de *A. chroococcum*;

(—) = frascos sem crescimento da bactéria.

Os resultados obtidos com o uso dos dois métodos são muito semelhantes, parecendo não haver diferenças devidas ao emprego de um ou de outro método.

Ambos os métodos dão o número de colônias de *Azotobacter* por grama de solo, de vez que a inoculação do meio de cultura é feita com o solo distribuído de tal maneira que suas partículas fiquem isoladas umas das outras. Nestas condições, as colônias que aparecem na superfície do meio de cultura são provenientes de colônias existentes em algumas partículas do solo em

exame, que não sofreram desagregação com o tratamento da amostra, e se desenvolveram por terem encontrado condições favoráveis.

Os métodos de Swaby e de Jensen procuram distribuir as bactérias sobre a superfície do meio de cultura. Fogem da técnica usual de se misturar o inóculo com o meio de cultura, porquanto as células de *Azotobacter* não se desenvolveriam no interior do agar por falta de oxigênio.

Em 5 dos 6 casos positivos, o método de Jensen acusou um número sensivelmente inferior de células de *Azotobacter* por grama de solo, do que o método de Swaby. Esses resultados podem ser devidos ao uso de dextrina como fonte de energia, no meio de cultura de Jensen. De fato, Gonick e Reuszer (4), estudando o efeito de vários compostos orgânicos sobre a multiplicação de *Azotobacter*, obtiveram, com dextrina, uma população apreciavelmente menor que a obtida com manitol.

Os resultados da tabela I, referentes ao número de colônias e de células de *Azotobacter* por grama de solo, concordam com os apresentados por Swaby (7), e indicam que as colônias dessa bactéria no solo são formadas de número relativamente pequeno de células.

Dos dois métodos qualitativos usados, o método das placas de solo apresentou melhores resultados que o da solução de Beijerinck. Os resultados obtidos com o primeiro concordam os obtidos com agar e sílica-gel. Em alguns solos, as colônias de *A. chroococcum* desenvolviam-se bastante bem sobre a superfície do solo moldado em caixas de Petri, apresentando-se espessas e brilhantes, ao passo que em outros formavam colônias muito finas, quase opacas, com diâmetro pequeno, mesmo naquelas caixas com pequeno número de colônias. O método pode fornecer, através da concentração das colônias sobre a superfície das placas de solo, indicações acerca da população de *Azotobacter* no solo em exame.

A solução de Beijerinck acusou presença da bactéria em apenas dois dos solos examinados, discordando completamente dos resultados apresentados pelos outros métodos. Nos dois casos positivos, somente o exame microscópico da solução acusou a presença de células de *Azotobacter*. Em todos os frascos houve desenvolvimento de bactérias anaeróbicas — *Clostridium* spp. — com desprendimento de maior ou menor quantidade de gases. Os resultados pouco satisfatórios obtidos com o uso da solução de Beijerinck podem encontrar explicação na concorrência feita por bactérias anaeróbicas, de desenvolvimento mais rápido, no consumo das substâncias usadas como fonte de carbono (10). É também possível que um crescimento vigoroso de *A. croococcum* em meio líquido só se manifeste quando o número de células no inóculo for relativamente grande (3).

4 — RESUMO E CONCLUSÕES

Seis métodos qualitativos e quantitativos foram usados simultaneamente para a determinação da ocorrência de *Azotobacter* em 16 amostras de solo. Foram usadas a solução de Beijerinck e as placas de solo de Winogradsky como métodos qualitativos; a sílica-gel de Winogradsky e o método de Curie para a contagem de colônias daquela bactéria, e o método de Swaby e o meio de dextrina-agar de Jensen para a determinação do número de células daquela fixadora de nitrogênio. 6 das amostras de solo deram resultado positivo quanto à presença da bactéria.

À vista dos resultados obtidos, pode-se concluir-se que :

4.1 — O método das placas de solo é mais eficiente que o das soluções nutritivas, para a determinação qualitativa de *A. chroococcum*.

4.2 — Os dois métodos de contagem de colônias apresentam resultados semelhantes. A sílica-gel pode ser substituída pelo agar, como substrato para o crescimento de *A. chroococcum*.

4.3 — O método de Swaby, com meio de manitol-agar, dá melhores resultados que o de Jensen, com dextrina-agar, na contagem de células dessa bactéria em solos.

5.2. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Six qualitative and quantitative methods were used for determining the occurrence of *Azotobacter* in 16 soil samples. The Beijerinck's solution and Winogradsky's soil plaques were used as qualitative methods, the Winogradsky's silica-gel plates and Curie's agar plates for colonies counts and Swaby's manitol agar and Jensen's dextrine-agar for cells counts. *Azotobacter* was present in 6 soil samples.

The following conclusions can be drawn:

5.1 — The soil plaque method is more efficient than the Beijerinck's solution for qualitative analysis of *Azotobacter* in soils.

5.2 — Both methods for colonies counts are similar. Agar may replace silica-gel as substratum for *Azotobacter*.

5.3 — The Swaby's manitol agar medium gives better results than does Jensen's dextrin-agar for counting *Azotobacter* cells.

6 — BIBLIOGRAFIA

- 1 — BEIJERINCK, M. W., 1901 — Uber oligonitrophile mikroben. Cent. Bakt. II abst., 7: 561-582.
- 2 — CURIE, I. W., 1931 — A method for the study of *Azotobacter* and its application to soil fertility plots. Soil Sci. 32: 9-24.
- 3 — GAINNEY, P. L., 1923 — Influence of the absolute reaction of a soil upon its *Azotobacter* flora and nitrogen fixing ability. J. Agric. Res., 24: 907-938.
- 4 — GONICK, W. N. e H. W. Reuszer, 1948 — The distribution of *Azotobacter chroococcum* and *A. winelandii* in Colora-

- do soils and surface waters. Proc. Soil Sci. Soc. Amer., 13: 251-257.
- 5 — MCKNIGHT, T., 1949 — Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms in Queensland soils. The Queensland J. Agric. Sci., 6: 177-195.
- 6 — PETERSON, H. B. e T. H. Goodding, 1941 — The geographic distribution of Azotobacter and Rhizobium meliloti in Nebraska soils in relation to certain environmental factors. Nebr. Agric. Exp. Sta. Res. Bull., 121: 1-121.
- 7 — SWABY, R. J., 1939 — The occurrence and activities of Azotobacter and clostridium butiricum in Victoria soils. Aust. J. Expt. Biol., 17: 401-423.
- 8 — WAKSMAN, S. A., 1932 — Principles of soil microbiology. Baltimore, The Willians & Wilkins Co., 2a. ed.
- 9 — WINOGRADSKY, S., 1925 — Études sur la microbiologie du sol : I. Sur la methode. Ann. Inst. Pasteur, 39: 299-354.
- 10 — WINOGRADSKY, S., 1926 — Études sur la microbiologie du sol : II. Sur les microbes fixateurs d'azote. Ann. Inst. Pasteur, 40: 455-520.