## Eng. Agr. Rodolpho de Camargo

Assistente da Secção Técnica de Microbiologia do Instituto Zimotécnico

88

# O DESENVOLVIMENTO DA FLORA MICROBIANA NOS SOLOS TRATADOS COM VINHAÇA ANÁLISE QUANTITATIVA

83

Tese apresentada para o concurso de doutoramento à Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», da Universidade de São Paulo — Outubro de 1953 —

	<ul> <li>Sometimes of the property of the</li></ul>	
	Rodo Chita	maker
	ÍNDICE GERAL	pgs.
I.	INTRODUÇÃO	• 1
II.	MATERIAL E MÉTODOS	
	C - Traçado da experiência, espaçamento entre os sulcos etc	• 5
	E - Amostragem F - Processo usado 1) - Discussão Métodos usados para a estimativa do número	. 11
	Metodos usados para a estimativa do numero de microorganismos	. 12
	direta da flora microbiana  II - Métodos de diluição  III - Métodos das placas de contagem  2) - Técnica  3) - Meio de cultura  Incubação das caixas de Petri  Contagem das colónias	<ul><li>13</li><li>15</li><li>17</li><li>19</li></ul>

Numero de contagens . .

30 32 36

III. RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO.

.VI

V.

CONCLUSÕES.

BIBLIOGRAFIA .

Gráficos . . Fotografias

Zaraf Jaury

Dois objetivos principais respondem pela apresentação do presente trabalho. O primeiro é a satisfação de uma exigência universitária que é a da defesa de uma tese para obtenção do título de doutor. O segundo, e principal, não é outro senão dar uma pequena contribuição ao estudo do tão discutido e complexo problema da vinhaça, problema êsse que afeta diretamente tôdas as regiões açucareiras e alcooleiras do Brasil.

O assunto, tão atualizado com as recentíssimas experiências do professor Almeida e colaboradores, com respeito às múltiplas utilidades da vinhaça, destacando-se entre elas a sua aplicação como fer tilizante, têm despertado a atenção dos interessados e estudiosos da questão, formando-se daí duas correntes:- uma, dos apoiadores e seguidores das teorías daquele professor; outra, dos que são contrários à elas por motivos que à nós, nesta tese, não cabe discutir.

Não entraremos também em considerações sôbre as vantagens, ou desvantagens, que possam advir da utilização da vinhaça como fertilizante, pois nossa intenção, frizamos, é apenas dar uma pequena parcela para o esclarecimento de um ponto ainda não convenientemente estudado, ou seja, a ação da vinhaça como ótimo meio para o desenvolvimento da flora microbiana dos solos

ALMEIDA (1), cita as seguintes vantagens, como consequentes da aplicação da vinhaça nos solos, qualquer que seja o seu tipo e o seu gráu de acidez, pela decomposição microbiana de sua matéria orgânica coloidal e dos ácidos orgânicos presentes:-

- A aplicada ao solo, eleva o seu pH, diminuindo sua acidez natural, chegando mesmo a alcalinisá-lo;
- B melhora as propriedades físicas e químicas dos solos;
- C aumenta o seu poder de embebição para a água;
- D ocasiona maior retenção dos sais minerais;
- E propicia ótimas condições para o desenvolvimento da cana de açúcar, do arroz, do milho, do trigo, do feijão , do algodão e das capineiras;
- F aumenta de maneira espantosa, qualitativa e quantitativamente, a microflora dos solos;
- G restaura, conserva ou aumenta a fertilidade dos solos.

Citados todos êsses itens, tomaremos apenas o que está colocado na letra F dessa classificação, que é o que a nós interessa

Today ( 1/10/2) -2-

para a execução das nossas pesquisas, e dos quais nos cabe comprovar a exatidão.

Dêsse item, estudaremos apenas o que se refere ao aumento quantitativo da flora microbiana, por ação da vinhaça, deixando o estudo qualitativo para um próximo trabalho, já que exige mais tempo e trabalho mais minucioso.

Propomo-nos a verificar o aumento quantitativo por razões <u>a</u> presentadas pelas maiores autoridades em Microbiologia de solo, razões essas que atestam a importância dêsse estudo, já que o número de microorganismos de um solo apresenta estreita relação, na ordem direta, com o seu índice de fertilidade.

WAKSMAN  $(37_a)$  já em 1922, salientava o valor de uma análise mi crobiológica dos solos como índice de fertilidade dos mesmos.

O mesmo WAKSMAN (37a) no mesmo ano, publicava uma nota relativa ao fato de que os fungos existem nos solos não sómente sob a forma de espóros, mas também como micélio, o que indica que êsses microerga nismos são ativos no solo, e como tal tomam parte no seu processo de fertilidade.

Não só a importância dos fungos foi por WAKSMAN estudada, mas também, a importância dos microorganismos em geral.

Referindo-se à fertilidade dos solos, citava êsse autor em 1916 (35) a importância das bactérias como fator dessa fertilidade.

Os processos químicos que ocorrem no solo, são para a maioria dos autores, segundo MILLAR e TURK (24), dependentes das atividades dos organismos vivos. O desenvolvimento e as atividades dos microorganismos estão intimamente ligados com a eficácia dos nutrientes e, por is so, a existência de plantas superiores depende das atividades dos microorganismos do solo.

• Além disso, um solo produtivo é caracterizado não necessària mente pela simples presença de grandes quantidades de nutrientes das plantas, mas pela rapidez com que êstes nutrientes são liberados de forma eficaz.

Ainda citando <u>MILLAR</u> e <u>TURK</u>, poderemos, para avaliar a importância dos microorganismos no solo, resumir suas ações benéficas em breves linhas.

Decolf & Sung

Funções benéficas dos microorganismos do solo 1 - Alterações da matéria orgânica e seus produtos de decomposição.

- 2 Fixação do Nitrogênio atmosférico.
- 3 Alterações nos constituintes inorgânicos do solo.

Poderemos citar também, como função importante a de que, apessar de não tomarem parte relevante no desenvolvimento da estrutura dos solos, agem os microorganismos de maneira indireta, sendo os responsáveis pela formação da matéria orgânica coloidal, que por sua vez promove a formação da estrutura granular, muito apreciável em solos.

Também, <u>SARLES</u>, <u>FRAZIER</u>, <u>WILSON</u> e <u>KNIGHT(29)</u> salientam que os microorganismos do solo têm um papel importante no contrôle das propriedades físicas e químicas dos solos, bem como da sua produtividade.

Ressalta em todos êsses itens e citações, a importância do estudo dos microorganismos do solo, e as razões pela qual optamos pelo estudo quantitativo primeiramente, além das atrás demonstradas, podem ser reunidas nas observações de autores conceituados no estudo dêsse ramo da Microbiologia.

Já em 1916, <u>WAKSMAN</u> (36), reconhecia ser o solo um meio favorável para a vida e suas atividades, e <u>KUBIENA</u> e <u>RENN</u> (20), em 1935, salientavam que a Microflora do solo sofre mudanças específicas quan do dos vários tratamentos sofridos por êsse, particularmente pela adição de qualquer substância orgânica capaz de se decompor.

Nos primeiros tempos, já se notava uma relação entre as atividades Microbiológicas e a fertilidade dos solos. RUSSEL e RUSSEL (27) estudaram essa relação, e através de vários trabalhos notaram que os solos ferteis apresentavam frequentemente maior conteúdo de nitratos, maior desprendimento de Co<sub>2</sub> e, o que é para nós de maior importância, maior número de microorganismos que os solos inférteis. Cer tamente, a conclusão teria que ser a de haver alguma relação entre o número de microorganismos e a fertilidade dos solos.

Não podendo haver mais dúvidas quanto à esta relação, basta ria a nós citar, como ponto básico da razão dêste trabalho, mais uma vez <u>WAKSMAN(58)</u>, que dá grande valor ao estudo quantitativo da flora microbiana dos solos e crê que êsse método de pesquisa dá idéia de tôda a flora microbiana dos solos, e pode servir de medida de seus estados microbiológicos.

Opina ainda êste mesmo autor, que os fenômenos microbiológicos mensuráveis, como a respiração do solo, sua capacidade de nitrifi

cação e de fixação de Nitrogênio, o número de seus microorganismos, etc., permitem julgar as propriedades do solo e sua fertilidade.

- Como vemos, as teorias de <u>RUSSEL</u> e <u>RUSSEL</u>, citadas mais atrás, vêm confirmar plenamente os trabalhos que WAKSMAN já desenvolvia e tornava públicos antes de 1932.

Verificada a importância do estudo quantitativo da flora microbiana dos solos, procuraremos também neste trabalho responder a perguntas que têm sido feitas ao Departamento de Microbiologia do Instituto Zimotécnico, perguntas essas em carácter oficioso e não oficial.

Relacionando-se com as experiências feitas para verificação do aumento quantitativo da flora microbiana dos solos tratados com vinhaça, estudaremos também a ação da adição de um volume de água igual ao da vinhaça, pois essas perguntas recebidas visam saber se o efeito de um tratamento não acarretaria em consequências iguais às do outro.

Conduzimos então as nossas experiências no sentido de mostrar os resultados, pertinentes ao aumento da microflora de um solo tratado com vinhaça, comparando-os com os de um solo tratado com água, e os de outro sem tratamento algum, que funcionaria como o testemunha da experiência.

Buscaremos em seguida, dar uma idéia do desenvolvimento de nossos trabalhos, para melhor esclarecimento das conclusões dos mesmos pedindo licença para primeiramente tornarmos públicos nossos agradecimentos à todos que trabalham na 11º Cadeira da E.S.A.L.Q., onde iniciamos nossas experiências, bem como à todos os funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto Zimotécnico, onde elas se completaram, sem o precioso auxílio dos quais, não seria possível sua realização.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

## A - Escolha dos terrenos e localização.

A experiência que serviu de base para a presente tese foi realizada em duas partes, iniciando-se em outubro de 1952, nos terrenos da Secção Técnica de Química Agrícola, e continuada em fins de agosto de 1953, em local de experimentação do Instituto Zimotécnico.

O local escolhido para a execução da primeira parte dos trabalhos, foi um solo pobre, sêco, arenoso, de topografia plana, localizado na área de propriedade da Secção Técnica de Química Agrícola.

Para a realização da segunda parte da experiência, escolhemos um tipo de solo argiloso, rico de matéria orgânica, também de topogra-

Lines of Louns

fia plana, localizado na Fazenda Modêlo, numa área onde o Instituto Zimotécnico realiza experiências de adubação com vinhaça, para cultura de cana de açúcar.

#### B - Preparo do solo e tratos culturais.

Em ambos os locais, o preparo do solo obedeceu à sequência comum de uma lavoura normal, isto é, o terreno foi primeiro arado, em seguida gradeado para, por último, ser sulcado, ficando assim pronto para receber os tratamentos.

Convém que se note que tôdas as operações foram executadas por máquinas e homens, sem que houvesse entrada de animais nos locais da experiência, para assim evitar-se a introdução de detritos orgâni-cos, os quais poderiam concorrer para influenciar os resultados finais dos trabalhos, de maneira prejudicial.

Os tratos culturais constaram sómente de capinas à enxada, pelas mesmas razões atrás enumeradas para o preparo do solo.

## C - Tracado da experiência, Espacamento entre os sulcos, etc..

Para a execução de ambas as partes dos trabalhos, deliberamos dividir o terreno em nove sulcos, já que se tratava de uma experiência com três tratamentos e três repetições.

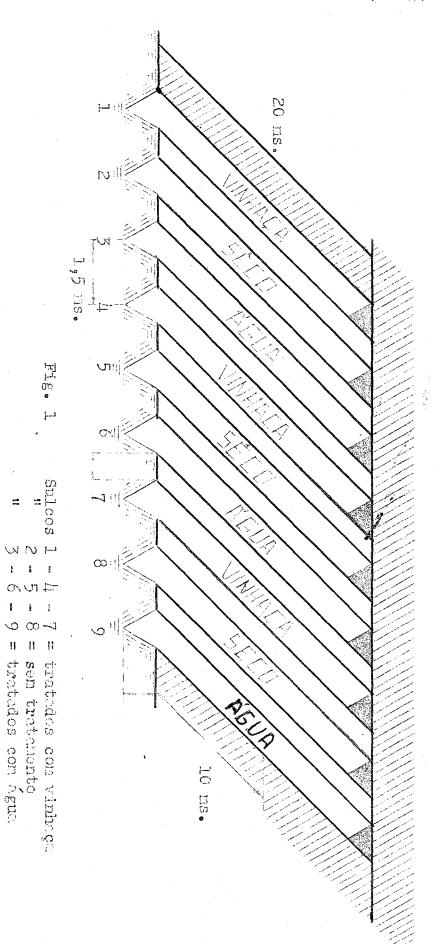
Na execução da primeira parte da experiência instalada no ter reno localizado na Secção de Química Agrícola, procedemos a divisão da seguinte maneira, de acôrdo com a figura 1:- nove sulcos de 20 ms de comprimento cada um, com um espaçamento de 1,5 ms entre sí, numerados de 1 a 9.

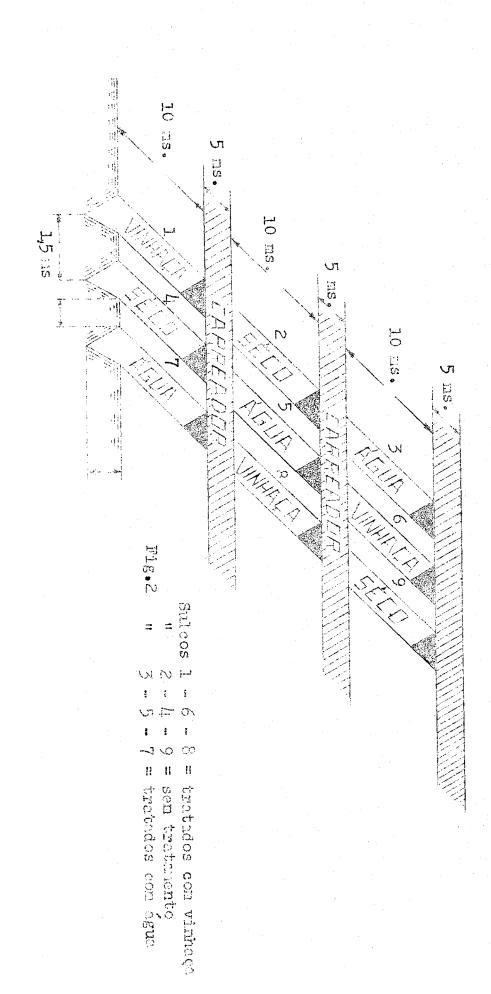
Os sulcos de números 1 - 4 - 7 receberam tratamento com vinha ça.

Os sulcos de números 3 - 6 - 9 receberam como tratamento um volume de água, igual aos tratados com vinhaça.

Os sulcos de números 2 - 5 - 8 permaneceram secos, não recebendo nenhum tratamento, isto é, fincionaram como testemunhas da experiência.

Dos 20 ms de comprimento de cada sulco, foram aproveitados para a colheita de amostras sómente os 10 primeiros metros à partir da linha de cabeceira, isto porque a parte detrás do canteiro permanecia sempre úmida em virtude da sombra aí projetada por uma plantação de eucaliptos, localizada atrás do talhão de experiência.





Rodol Hol Duard

Para a divisão do terreno localizado na área do Instituto Zimo técnico, procedemos como é demonstrado na figura 2, traçando sulcos de 10 metros de comprimento distanciados de 1,50 metros entre sí, e separados por carreadores de 5 metros.

Os sulcos foram também numerados de 1 a 9, sendo que os de números 1, 6 e 8 foram tratados com vinhaça, os de números 3, 5 e 7 rece beram água, e os de números 2, 4 e 9 permaneceram sem tratamento.

## D - Quantidades de Vinhaça e Água.

Cada sulco recebeu 1.000 ls de vinhaça, ou seja, vinhaça na base de 100 ls por metro linear (1.000.000 de litros por hectare), que é a quantidade preconizada pelo Instituto Zimotécnico de Piracicaba para solos pobres e onde surgiram os primeiros trabalhos concernentes à aplicação de restilo como restaurador de terras.

Sendo de três o número de sulcos que receberam vinhaça, para cada experiência, gastou-se por consequinte 6.000 ls. da mesma, na complementação de ambas as partes dos trabalhos. Devemos salientar que a vinhaça utilizada foi proveniente de fermentação sulfúrica (U.M.A.) na primeira parte da experiência, e natural (U. Santa Helena) na segunda parte. Isso não foi feito buscando algum novo resultado, mas sim pelas facilidades de obtenção e transporte com que foi conseguida a vinhaça, nas diferentes épocas de realização das experiências. Ademais, não seria de se esperar que quaisquer resultados novos aparecessem da aplicação de dois diferentes tipos de vinhaça, visto que, qualquer que seja o tipo de fermentação usado, pouca diferença mostra a composição da vinhaça, seja ela proveniente de fermentação, natural, sulfúrica ou pentaclorofenólica, como mostra o quadro anexo, realizado através de a nálises efetuadas no Instituto Zimotécnico.(1)

### COMPOSIÇÃO MÉDIA DA VINHAÇA DA U.M.A.

•	NATURAL	SULFÚRICA	PENTACLORO FENÓLICA	MÉDIA
Água Sólidos totais M. organica nos sólidos M. mineral nos sólidos N em gramas por litro P em gramas por litro Ca em gramas por litro K em gramas por litro Outros elementos em	93,278%	93,490%	92,720%	93,163%
	6,722	6.510	7,280	6,837
	5,045%	4,692%	5,617%	5,118%
	1,677	1,818	1,663	1,719
	1,160	1,253	1,110	1,174
	1,250	1,723	1,490	1,487
	2,696	2,650	2,546	2,630
	11,486	12,350	11,136	11,657
gramas por litro	1,338	1,457	1,458	1,416
	4,85	4,84	4,95	4,88

Lodoch fldwafer

Para os sulcos tratados com água, também em número de seis, co mo já vimos, os cálculos foram feitos na mesma base, isto é, 1.000 ls por 10 ms de sulco, num total de 6.000 litros na experiência tôda.

Tanto a água, como a vinhaça, foram transportadas para os locais de realização das experiências pelo caminhão-tanque do Instituto Zimotécnico, que já é apropriado para êsse fim.

#### E - Amostragem.

A amostragem do material para os trabalhos de laboratório, foi feita de maneira simples, procurando seguir, na medida do possível, a técnica proposta por FRED e WAKSMAN (12):- "As amostras, da superfície a um pé de profundidade, devem ser tomadas pela técnica que segue:-

Remover a superfície grosseira e introduzir um cilindro de metal ou outro qualquer instrumento apropriado para a amostragem, até a profundidade desejada. As amostras da superfície do solo devem ser to madas com uma espátula esterilizada. Tirar tôdas as amostras e colocá las em sacos de papel esterilizados, ou outra qualquer espécie de vasilhame. Misturar bem as amostras, para sua homogeneização e, em seguida, pulverizá-las. Estas operações devem ser feitas com o auxílio de uma espátula esterilizada. Depois da homogeneização e pulverização, a amostra representativa deve ser levada para a diluição. Para uma maior redução do êrro comum em tais operações, é conveniente que se use uma amostra do solo relativamente grande. Quanto às balanças, para a pesa gem das amostras, uma sensibilidade até 10 grs. é satisfatória, para esta espécie de trabalho".

No nosso caso, como já dissemos, seguimos a técnica proposta por FRED e WAKSMAN, na quasi totalidade de seus itens.

Não nos foi possível, no entretanto, conseguir boas amostras da superfície dos solos tratados com vinhaça pela imensa riqueza apre sentada por ela em microorganismos, riqueza essa traduzida claramente pelo incomensurável número de colônias alí desenvolvidas, formando uma capa completamente visível à ôlho desarmado, e onde predominavam fungos tais como: Neurospora spp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Mucor spp., etc., e Streptomyces spp.. A classificação dêstes microorganismos foi feita de acôrdo com GILMAN (14), e uma vez reconhecidos seus gêneros foi dada como terminada, já que se trata esta tese de uma Análise Quantitativa, e não Qualitativa.

Abstivemo-nos então, da amostragem da superfície dos solos, pe la impossibilidade de contagem do infinito número de colónias formados, quando levado o material ao isolamento em placas.

Zodsephofamarko -10-

Além do mais, a superféie dos solos, já por sí é de uma grande fertilidade, independentemente de qualquer tratamento que sofra, ou dei xe de sofrer, o terreno (CONN -(-4).

As amostras foram por nós tiradas então, na camada compreendida entre 8 e 16 cms de profundidade, com o auxílio de uma pequena pá metálica esmaltada, flambada antes de cada introdução no solo, sendo as amostras em seguida colocadas em latas tampadas, previamente esterilizadas em estufa a 160ºC durante duas horas.

De cada sulco foram tiradas três amostras de terra, cada uma de um ponto diferente, dentro do espaço compreendido entre os 10 metros, reunindo-se essas sub-amostras na lata receptora das mesmas.

Dessa maneira, foram obtidas então nove latas, para cada experiência, correspondendo cada uma delas às três sub-amostras do sulco correspondente.

Isto feito, tomamos as latas com amostras do mesmo tratamento, transportando-as imediatemente para o laboratório onde foram reunidas em uma cuba de vidro esterilizada.

Resultaram, portanto, três amostras médias, ou sejam:-

CUBA V:- com material dos três sulcos com vinhaça

n A: u u u u ú água

" S:- " " " sem tratamento.

Nestas cubas, com o auxílio de uma espátula esterilizada, sofre ram uma homogeneização. Em seguida, foram pulverizadas com o auxílio de uma peneira reticular milimétrica, para logo após, passarem pela pesagem como última fase da amostragem. Imediatamente procedemos ao trabalho do preparo das placas de Petri.

O número de amostragens feitas, tanto m primeira, como na segum da parte das pesquisas, foi de onze (11) para cada uma. Estabelecemos os limites mínimo de cinco e máximo de dez dias, para o espaço de tempo entre uma colheita de amostras e outra.

Além dessa técnica seguida, todos os cuidados preliminares como esterilização do material de colheita a ser usado, rotulagem das latas para evitar desastrosas confusões das amostras, etc., foram observados à rigor, para evitar possível contaminação do material em exame falseam do os resultados obtidos.

Segundo WAKSMAN (38), devem ser tomados cuidados especiais no sentido de evitar a contaminação das amostras com outro solo, ou pela exposição muito demorada das mesmas à atmosfera. Contudo, não é necessária uma absoluta esterilidade no processo de amostragem, vis-

Lodolf Roding

to que o número de microorganismos do solo é muito grande, relativamente a uma provável contaminação proveniente de uma breve exposição da a mostra.

A maior importância nos cuidados a serem tomados com as amos - tras, está em não permitir-se que as mesmas permaneçam por muito tem - po guardadas em laboratório. É que uma rápida mudança pode se efetuar na quantidade de microorganismos do solo, quando a amostra for conservada por um espaço de tempo, ainda que pequeno.

Alguns pesquisadores, ainda citando WAKSMAN (38), encontraram uma forte queda na quantidade de microorganismos, motivada pela demora em se proceder o trabalho de preparação das placas.

Em se tratando de solos normais, êsse decréscimo da quantidade de microorganismos poderser esperado. Êle aumentará proporcionalmente ao número de dias que permanecer guardada a amostra.

Porém, um aumento é o que se registra, quando se trata de solos nos quais as atividades dos microorganismos tenham sido postas em evidência. É o caso de solos sêcos que sofreram um tratamento à base de umidade, ou quando as amostras são de baixas profundidades, etc..

Tanto o decréscimo, como o acréscimo no número de microorga - nismos, é igualmente prejudicial aos resultados finais das experiên - cias, razão pela qual procuramos sempre conduzir os nossos trabalhos sem que êles sofressem solução de continuidade.

#### F- Processo usado

#### 1-Discussão

O estudo da Microflora dos solos está debaixo de investigações há mais de 70 anos, e ainda há discussões sôbre os métodos de pesquisa, não havendo, segundo CONN (5), um que possa servir como básico para fornecer informações e dados necessários e precisos, de maneira a se tornar mais claro.

Sôbre os métodos de isolamento e estudo microbiológico dos solos, vários são os propostos pelas autoridades do assunto, salientando se entre estas, figuras como CONN, WINOGRADSKY, WAKSMAN, etc..

Antes de opinarmos sobre a adoção de um método para nossas peg quisas, procuramos saber, por meio de testes e dos principais trabalhos existentes com referência à Análise Quantitativa da flora microbiana dos solos, quais os que nos possibilitariam melhores resultados.

De todos os métodos existentes no que concerne às Análises Microbiológicas dos solos, poderemos acompanhar WAKSMAN(37), SALLE (28), e FROBISHER (13) na sua sintetização dêsses vários métodos, grupando os em apenas três classes:-

I - Método microcópico, para observ<u>a</u> ção direta da flora microbiana

II - Métodos de diluição

III - Métodos das placas de contagem

Métodos que podem ser empre gados na estimativa da quan tidade de microorganismos do solo

# I - Método Microscópico, para Observação Direta da Flora Microbiana

Êste método de observação foi ideado por CONN (6) em 1917 e lo go em seguida modificado por WINOGRADSKY (46). Consiste em efetuar preparações coloridas, microscópicas, diretamente do solo. tiria a observação da flora microbiana do solo, realmente como ela é. A importância dêste método para nós é, no entanto, relativa, pois além de não permitir que se distinga especificamente os microorganismos ainda impede um estudo quantitativo razoável.

Como método de observação direta encontramos ainda, o processo de ROSSI (26), redescoberto por CHOLODNY, e citado por CONN (6), que consiste em colocar lâminas aderidas contra a superfície recém-cortada de um solo e, em permitir o desenvolvimento dos microorganismos que se encontram na mesma, na superfície da lâmina durante 8 a 15 dias para, em seguida a esse espaço de tempo, secar os preparados e colorí-los. Também, esse método, apesar de muito importante para o estudo qualitativo, não apresentou resultados que justificassem sua utilização em nos sa tese.

Várias modificações foram introduzidas ainda nesses métodos observação direta, citando-se como de maior importância as de SORIANO (32), YAO-TSENG (48), CONN (6), JONES e MOLLISON (19) e muitas outras.

Em nossos trabalhos, não nos utilizamos dos métodos de observa ção direta pelas seguintes razões:

- A Em se tratando nossa tese de Análise Quantitativa, um inconveniente maior se apresentava, pois êstes métodos admitem uma confusão na contagem, já que as células mortas são contadas juntamente com as vivas;
- B para uma melhor determinação do número de microorganismos, os Méto dos Microscópicos são de pequeno valor, pela dificuldade em se dis tinguir as bactérias menores, de partículas de solo. CUNNINGHAM
- C o número de microorganismos em uma grama de solo é surpreendente mente alto. Os Métodos Microscópicos acusam sempre uma quantidade de no mínimo dez vezes mais microorganismos. Como a vinhaça eleva

de maneira espantosa espantosa essa quantidade, consequentemente as probabilidades de resultados errados cresceriam com a utilização desse método;

D - KUBIENA e RENN (20) estudando a influência dos diferentes compostos orgânicos sôbre a microflora do solo, chegaram à conclusão de que não apresentam os Métodos de Observação direta, resultados satisfa tórios, quando comparados com os Métodos de Diluição e os das placas de centagem.

#### II -Métodos de Diluição

Consistem em agregar-se a um determinado meio de cultura líquido, diferentes diluições de um solo em água esterilizada e comprovar em seguida qual a maior diluição a que se pode chegar, para que ainda se produza o processo que se quer estudar. Foi o Método de Diluição sugerido por HILTNER e STÖRMER, e citado por WAKSMAN (38).

Os Métodos de Diluição podem ser utilizados não sòmente para a determinação da microflora total, mas também, para o estudo de grupos fisiológicos específicos, estudo êsse que por nós não foi efetuado. WAKSMAN (37) tecendo considerações sôbre o uso dêste método em análise microbiológica de solo rotineira, classifica-o como enfadonho, por envolver um número muito grande de diluições e culturas para cada solo, e também, porque, sômente resultados aproximados podem ser obtidos, particularmente em vista do fato de que a ação seletiva do meio de cultura possa se manifestar.

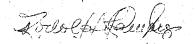
JAMES (18), estudando o Método de Diluição, concluiu que o mes mo, quando utilizado na estimativa de microorganismos do solo, dá uma aproximação de seu número muito errada. Crê o citado autor, que tal método não se encontra ainda suficientemente desenvolvido.

Conclue-se que é o Método de Diluição, um método simplista, mas que sub-estimando em muito o número de microorganismos de um solo, torna-se preferível a sua não utilização como Método de Análise Quantitativa para microorganismos de solo.

Em nossa tese usamos o Método de Diluição, pela sua vantagem em permitir o desenvolvimento de todos os microorganismos conhecidos, apesar de diminuir em muito o número de microorganismos por grama de solo. Tal método não foi usado em sua técnica pura, mas sim em uma associação com o Método das Placas de Contagem, procurando-se assim a obtenção de melhores resultados, pela eliminação do máximo de falhas que ambos os métodos possuem.

## III - Método das Placas de Contagem

Este método consiste em diluir-se o solo com água esteriliza -



da, fazendo-se uma série de diluições, de forma tal que l c.c. da diluição final, quando colocado em nutriente agar ou gelatina, permite que 40 a 200 colónias se desenvolvam na placa.

RUSSEL e RUSSEL (27) citam a técnica proposta por THORNTON e GRAY, a qual descrevem como muito usada por êstes autores para a conta gem do número de microorganismos do solo, alegando ainda ser êste um método muito mais indireto que os anteriormente citados neste trabalho.

O processo de THORNTON e GRAY, comumente denominado "plating technique", consiste em se tomar uma quantidade conhecida do solo a ser analisado, e submeter uma amostra a uma agitação com um volume conve-niente de água esterilizada. Seguem-se diversas diluições dessa pri-meira suspensão, para logo após proceder-se os isolamentos em caixas de Petri, com o meio de cultura adequado. Depois de incubadas essas caixas em estufa, por um número conveniente de horas, as colónias de microorganismos estarão desenvolvidas, sendo então feita a contagem das mesmas, calculando-se a quantidade por grama de solo.

Um inconveniente que pode aparecer nesta técnica, é que o número de microorganismos assim calculado pode unicamente ser considerado o número presente no solo se:-

- a) cada colónia desenvolvida for proveniente de um único microorganismo;
- b) todos os microorganismos da amostra de solo são trazidos para a suspensão;
- c) todos os microorganismos da suspensão podem crescer no meio nutriente usado.

Nenhuma destas condições é porém segura; algumas colónias de microorganismos parecem estar fortemente ligadas entre sí por alguma substância gomosa; algumas partículas de solo e de matéria orgânica são prêsas aos organismos de forma tal que impedem que a dispersão dos mesmos no meio de cultura seja completa; alguns microorganismos não podem se desenvolver em íntima aproximação com outros (39); e, ademais, nenhum meio nutriente foi ainda descoberto, no qual todos os microorganismos do solo se desenvolvam igualmente.

Assim sendo, concluimos que este método também sub-estima o número de microorganismos.

CONN (7), comparando os vários Métodos de Contagem de microorganismos, entre os quais o Método das Placas; o Método de REMY-LÖHNIS, para inoculação de solo em vários meios de cultura específicos; o Método de HILTNER-STÖRMER; o Método de Diluição e a técnica

That the John To

microscópica proposta por CONN, concluiu que ao lado das várias falhas apresentadas por todos os métodos citados, o "plating technique" apresenta duas desvantagens principais, que são:-

- I não dá resultados satisfatórios quanto às espécies de microorganismos;
- II dá apenas uma parte da quantidade total de microorganismos existentes no solo.
  - O primeiro item, para nós, carece de importância.

O segundo, já apontado por THORNTON e GRAY, e RUSSEL e RUSSEL, à primeira vista pode parecer de importância principal.

No entretanto, para a realização desta tese não se torna de tão grande importância assim, pois dada à enorme quantidade de micro-organismos encontrada nos solos após o tratamento com vinhaça, interes sante se tornaria a utilização de um método que sub-estimasse um pouco essa quantidade, para maior facilidade de contagem e também para que assim as probabilidades de erro se tornassem diminuidas.

Além disso, o erro verificado nesse método é mínimo quando comparado com os dos demais processos.

Também se tem a considerar que o fato de ser sub-estimada a quantidade de microorganismos nos solos tratados com vinhaça, não ocasiona maior transtorno nos resultados finais da pesquisa, pois também são sub-estimadas as quantidades dos solos tratados com água e as do testemunha, verificando-se assim apenas um êrro comparativo.

WYANT (47), fazendo um estudo comparativo entre as diversas técnicas de Análise Quantitativa de solos, levanta para solução os seguintes pontos:- 1) a quantidade de solo usado na amostragem; 2) a proporção de solo usado para a primeira diluição, em relação ao volume de líquido utilizado; 3) o tamanho da segunda diluição; 4) a técnica para transferir diluições contendo visíveis quantidades de solo; 5) a base para a estimativa total dos números de microorganismos.

Em nossa descrição do desenvolvimento da técnica por nos utilizada, procuraremos responder à todos esses itens.

## 2 - Técnica

A quantidade de solo na amostragem, primeiro item a responder, foi relativamente grande. As nossas amostras de solo foram todas elas de mais de 1.000 grs.. Isso foi feito com o fim de se conseguir uma boa média do solo a ser estudado.

Como vimos no início deste trabalho, nossas pesquisas consta-

Lacet Deceptor

ram de duas séries de experiências. Na primeira (Secção de Química A-grícola), conduzimos as diluições desde 1/10 até 1/1.000.000, já que mais não se tornava necessário, visto tratar-se de um solo relativamen te pobre. Quanto à segunda (Área do Instituto Zimotécnico), necessitá mos levar as diluições de 1/10 até 1/10.000.000, pois o solo era muito mais rico em matéria orgânica, e ofereceu resultados supreendentemente muito mais elevados.

A proporção de solo usado na primeira diluição foi de 1/10. WyANT (47) propõe que se use de 0,25 a 100 grs. de solo para a primeira diluição. Nós preferimos uma amostra de 50 grs. de solo, para sofrer diluição em 500 c.c. de água esterilizada. A razão desta nossa escolha foi motivada pela importância de se usar uma quantidade de solo relativamente grande na primeira diluição, e também, de se fazer uma di luição relativamente baixa, como a de 1/10 por nós executada.

Essa importância a que nos referimos deve-se ao fato de que, quanto maior a amostra de solo, maior capacidade representativa do mes mo, ela oferece.

WAKSMAN (38) e CORBET (9) preconizam esta mesma técnica, através de pesquisas realizadas com pleno êxito.

Esta diluição primeira, foi feita em frascos Erlenmeyer de 1.000 c.c. e submetida a agitação por cinco minutos, para homogeneização da suspensão.

A segunda diluição que utilizamos foi de 1/100, realizada com o auxílio de uma pipeta bacteriológica de 1 c.c., transferindo êsse volume, da primeira diluição para um tubo de ensaio com 9 c.c. de água esterilizada. De idêntica forma procedemos para as sucessivas di luições, até a obtenção das suspensões finais, respectivamente de ... 1/1.000.000 e 1/10.000.000.

Escolhemos a proporção da segunda diluição, baseados em vários autores, entre êles FRED (11) e GILTNER (15), que aconselham que se use as diluições de 1/10 e 1/100, primeira e segunda respectivamente, o que foi por nós seguido.

SCHNEIDER (30) em 1920, preconizava o uso das diluições 1/100 e 1/1.000 como as primeiras, as quais não foram adotadas em nossos trabalhos, por razões já atrás citadas.

As nossas diluições foram, como já dissemos, até 1/1.000.000 e 1/10.000.000, além dos motivos alegados linhas atrás, por que WAKSMAN (40) ressalta a importância de se preparar suspensões a 1/100.000, 1/1.000.000 e até mais, para que o aparecimento dos fungos se processe

Leach House

de uma maneira satisfatória, já que é o número de fungos muito menor, do que o dos outros grupos. As diluições baixas favorecem o desenvolvimento das colónias de Bactérias e Actinomycetos.

Quanto à técnica da qual nos servimos para a transferência das diluições para as caixas de Petri, foi a mais utilizada pela maioria dos microbiologistas, e que consta apenas do uso de pipetas bacterioló cas de l c.c., esterilizadas.

Tendo-se o cuidado de não se usar a mesma pipeta mais do que uma vez, transferimos l c.c. de cada diluição para as placas correspondentes.

Para cada tipo de solo, procedemos duas séries idênticas de isolamentos, procurando assim obter resultados mais seguros e, evitar na medida do possível resultados falsos.

De tôdas as diluições, utilizamo-nos para proceder o isolamento, apenas das compreendidas entre 1/1.000 e 1/10.000.000, restando as diluições de 1/10 e 1/100 apenas como auxiliares do processo.

Com referência ao último item proposto por WYANT, ou seja, a base para a estimativa total do número de microorganismos, temos a dizer que seguimos a técnica de WAKSMAN (38), que consta de se estabelecer limites quanto à contagem do número de colónias, nunca se contando as caixas com mais de 300, e com menos de 3 colónias.

Fugimos, porém, algumas vezes à esta técnica, para possibilitar assim uma melhor verificação dos resultados obtidos.

#### 3 - Meio de cultura.

Os meios de cultura empregados em Análises Quantitativas Microbiológicas de Solos, devem satisfazer uma série de exigências, para as sim permitir o desenvolvimento do maior número possível de representantes da flora microbiana.

• De acôrdo com WAKSMAN (38), deve ser o meio de cultura uniforme em sua composição, e devem também, ser empregados em sua composição sais inorgânicos. No caso de serem necessárias substâncias orgânicas, estas devem ser puras, estáveis e uniformes o quanto possíveis, como no caso das fontes de carbono e nitrogênio. Vários açúcares ou ácidos orgânicos servindo como fontes de carbono, podem ser obtidos em uma forma pura e regular. As substâncias nitrogenadas devem entrar na com posição do meio de cultura em quantidades tão pequenas quanto possível.

Mesmo o agar, que sozinho não serve como nutriente, deve ser de uma pureza máxima.

A adição de matéria orgânica deve ser a mínima possível, para

Kodolf Raduoko

dessa forma impedir-se o desenvolvimento muito rápido de certos microorganismos que possuem essa propriedade, e que por isso impedem o cres
cimento de um numeroso grupo de bactérias, grupo êsse dotado de um pro
cesso de desenvolvimento muito lento.

Para CONN (5), existem duas condições principais, que aliás, vão de acôrdo com as idéias de WAKSMAN acima citadas, que devem ser sa tisfeitas pelos meios de cultura utilizados em Análises Quantitativas, que são:-

- a) pouca matéria orgânica;
- b) baixa temperatura de incubação.

Os meios de peptona são especialmente insatisfatórios, porque a peptona permite um sobre-crescimento de microcrganismos formadores de esporos (spore-formes) e proteolíticos. Os mesmos resultados, acarreta a incubação das caixas à uma temperatura mais elevada que a do meio ambiente.

Os meios de cultura mais conveniente usados são os de gelatina e de agar, além das placas de sílico-gel propostas por WINOGRADSKY (46), que são usadas mais especificamente. No caso da utilização de meios de cultura de gelatina, não devem ser adicionados outros nutrientes além dos sais presentes na água.

Se o agar for empregado, naturalmente devem ser adicionados nutrientes, mas em combinação com os sais minerais é conveniente incluir-se na composição do meio não mais do que 0,1% de glucose, e uma quantidade similar de algum amino-ácido, sais de amônio, ou nitratos.

Em nossas pesquisas, utilizamo-nos de três meios de cultura. Na primeira parte de nossas experiências, trabalhamos com o meio de cultura de gelatina, proposto por CONN (4), e com um meio de agar, sugerido por SOUZA CARVALHO, e baseado na técnica de CONN (5). O meio de cultura de gelatina teve logo que ser abandonado, pois tornava-se impossível a contagem das colónias dada a liquefação do mesmo.

Prosseguimos então, apenas com o meio não-seletivo de SOUZA CARVALHO.

Na segunda parte de nossos trabalhos, além dêste último meio introduzimos um outro, para microorganismos proteolíticos, preconizado por WAKSMAN (38). Éste meio foi usado, não porque seja o melhor para o estudo Quantitativo, mas por uma série de razões:- a) permite um maior desenvolvimento, tanto de fungos como de bactérias, sôbre as condições dadas, isto é, dá meios para uma comparação dos números en-

Todocp Ramage.

tre os dois mais importantes grupos de microorganismos existentes, sôbre absolutamente as mesmas condições; b) é um meio de cultura relativamente pobre, permitindo dessa forma um pequeno desenvolvimento de todos
os microorganismos; c) permite um melhor desenvolvimento de todos
os diferentes grupos de microorganismos, em comparação com os outros
meios de cultura estudados.

COOK (8) estudando os diferentes meios de cultura para Análise Microbiológica de solos, também concluiu que o meio de WAKSMAN é o que apresenta resultados mais substanciosos.

Outro ponto a se considerar no que concerne aos meios de cultura, é a questão de sua reação.

Uma pequena acidez é o usualmente recomendado como reação ótima; elevando-se a acidez há uma diminuição no número de bactérias, a companhada de um sôbre-crescimento de fungos. Quando a acidez é, no
entretanto maior, verifica-se também uma queda em números, particularmente nas proximidades do pH neutro, razão pela qual, com uma alcalini
dade de 7,6 há ao total, menor quantidade do que a metade das colónias
que se desenvolvem com uma reação ácida de 6,4. Um pH 6,5 é portanto
ainda melhor. Em certos casos porém, verifica-se a necessidade de se
utilizar um meio de cultura de reação levemente alcalina ou então neutra (7,2 - 7,0) como o que nos foi sugerido por SOUZA CARVALHO.

Para o meio de cultura de gelatina, CONN propôs uma reação neu tra, e para o meio de WAKSMAN, o pH preconizado foi de 6,5.

Ajustadas as reações dos meios de cultura, foram êles distribu<u>i</u> dos em tubos de cultura, na quantidade de 10 - 12 c.c. por tubo.

Com relação à esterilização, a técnica seguida foi a geralmente em uso, sendo feita em autoclave à l atmosfera durante 20 minutos.

Incubação das caixas de Petri: Após preparadas as caixas de Petri, foram elas levadas à estufa. Há discussões quanto a temperatura de incubação, bem como com relação ao número de horas em que devem permanecer incubadas, visando com isso buscar uma técnica conveniente para um bom desenvolvimento das colónias, para que a contagem se processe em condições satisfatórias.

LE CLERG e SMITH (21), estudando os solos de Colorado, opinaram pela incubação à 22 - 23ºC, sendo o tempo de 48 - 72 horas.

WIERINGA (45), também chegou a conclusões que o levaram a usar  $\epsilon$  mesma técnica quanto à duração da incubação, variando, porém, a temperatura, a qual conduziu até 25°C, para meios de cultura com agar.

A técnica proposta por WAKSMAN (38) é a que melhores resulta-

Loweth Sulory

dos apresenta em seu conjunto, razão pela qual foi tomada como base para o nosso processo.

Constou então o nosso trabalho, no que se refere à parte de incubação, da técnica seguinte: as caixas de Petri foram incubadas a temperatura constante, ao redor de 25ºC para os meios de agar, enquanto que para o meio de gelatina, a incubação foi feita a 18ºC.

Essas caixas permaneceram na estufa durante 48 - 72 horas, sendo feita a contagem ao término das primeiras 48 horas, e comprovada, por uma nova contagem, ao se completarem as 72 horas.

Um menor período de incubação pode ser insuficiente para o desenvolvimento dos microorganismos, assim como são igualmente insatisfatórias as condições de temperatura, seja ela abaixo ou acima do ponto conveniente.

Baixas temperaturas requerem um período muito longo de incubação, enquanto que temperaturas altas, especialmente quando superiores a 30°C, tem uma ação deveras prejudicial sôbre o desenvolvimento dos mi croorganismos, além do fato de se secar o meio de cultura das placas.

Descrita a técnica por nós utilizada para o emprego dos diferentes meios de cultura, daremos abaixo suas diferentes fórmulas, para melhor compreensão das razões de sua utilização.

_	
1)	Meio de Cultura de CONN
	H <sub>2</sub> 0 1.000 c.c.
	Gelatina 12 %
	pH - 7,0
2)	Meio de Cultura de CONN - SOUZA CARVALHO
	Glucose 1 g.
	Nitrato de sódio 1 g.
	Fosfato bibásico de
	potássio 0,5 g.
•	Agar
	Água 1.000 c.c.
	pH - 7,00 - 7,2

Todo Chadages

#### 3) Meio de Cutura Agar de WAKSMAN

Água destilada 1.000 c.c	
Agar 15 g.	
Caseina pura 1 g.	
Glucose 1 g.	
Sulfato de Mg cristalizado 0,2 g.	
Fosfato bibásico de potássio . 0,5 g.	
Sulfato ferroso traços	
pH - 6,5	
***	

## Contagem das Colónias.

Após a incubação das caixas de Petri por 48 - 72 procedemos a contagem das colónias nela desenvolvidas.

Essa contagem foi feita em placas de Wolfhügel, sendo aquí tam bém seguida a técnica de WAKSMAN (38).

Quando as caixas apresentavam um número de colónias entre 40 e 200, dispensamos o auxílio das placas de Wolfhügel procedendo a contagem por meio de uma simples divisão, com o emprêgo de lápis dermatográfico, das citadas caixas, em 4,5 ou mais campos.

Quando, porém, o número de microorganismos ultrapassava a 200, obrigatória se tornava a utilização das placas de contagem.

É convencionado não se contar as caixas que apresentem menos de 3 e mais de 300 colônias.

Em nossos trabalhos, algumas vezes escapamos, porém, dessa técnica, visando com isso, apenas fornecer dados mais completos, para melhor esclarecimento dos resultados apresentados no final desta tese.

Tendo o número de colónias por caixa de Petri, calculamos a quantidade de microorganismos por grama de solo, bastando para isso multiplicar a quantidade de colónias obtidas pela diluição correspondente.

Os resultados finais das contagens efetuadas são encontrados no final deste trabalho, apresentados por meio de gráficos, possibilitando dessa forma, uma melhor compreensão dos mesmos.

<u>Número de contagens:-</u> Foram feitas onze contagens para cada experiência.

as contagens se procederam dentro de um espaço de tempo de cinco a dez dias, entre uma e outra, sendo êsse fato motivado pela amostra gem, já que muitas vezes não se poderiam efetuar as colheitas de amos-

Zedred Jougho.

tras por influência das condições atmosféricas.

Em ambos os tipos de solo utilizados, fizemos a contagem primeiramente de todos os sulcos antes de receberem tratamento, para se tirar assim uma base da quantidade de microorganismos existentes debaixo das condições naturais apresentadas pelo terreno.

Depois que êsses sulcos receberam os tratamentos estabelecidos, iniciamos as contagens, para assim efetuar o estudo comparativo da influência dos diferentes tratamentos usados, com respeito ao aumento quantitativo da flora microbiana, que nos propuzemos a realizar no início desta tese, e que constitue sua razão principal.

#### III - RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

#### A) <u>Isolamento e Contagem</u>

Os resultados obtidos no decorrer dos trabalhos, podem ser sintetizados em dois quadros, baseados nas contagens obtidas.

#### QUADRO I

Contagens dos diferentes isolamentos da la Parte das experiências.

(Solo da Secção Técnica de Química Agrícola)
Diluição 1/1.000.000

		Dirargao 1/1	
Isola- mentos	Tratamentos	№ total de Colónias	Nº de microorganimos por grama de solo
		(MÉDIA)	(média)
10	Vinhaça	1,5	1.500.000
	Seco	1	1.000.000
	Agua	4,5	4.500.000
20	Vinhaça	355	355.000.000
	Şeco	215	2.500.000
	Agua	4	4.000.000
3º	Vinhaça	131,5	131.500.000
	Şeco	1	1.000.000
	Agua	2	2.000.000
<b>4</b> º	Vinhaça	137,5	137.500.000
	Seco	2	2.000.000
	Agua	2	2.000.000
5º	Vinhaça	104	104.000.000
	Şeco	2	2.000.000
	Agua	7	7.000.000
6₽	Vinhaça	99,5	99.500.000
	Seco Água	1,5	1.500.000
7♀	Vinhaça	73,5	73.500.000
	Şeco	3	3.000.000
	Agua	6,5	6.500.000

Transfer Kondingly

Isola- mentos	Tratamentos	Nº total de Colonias	Nº de microorganismos por grama de solo
	2	(MÉDIL)	(MÉDIA)
82	Vinhaça	33,5	33.500.000
	Seco	1,5	1.500.000
	Água	1,5	1.500.000
92	Vinhaça	17	17.000.000
	Sêco	1	1.000.000
	Âgua	2	2.000.000
102	Vinhaça	35,5	35.500.000
	Seco	2,5	2.500.000
	Agua	3,5	3.500.000
110	Vinhaça	25,5	25.500.000
	Şeco	1,5	1.500.000
	Agua	2,5	2.500.000

### QUADRO II

Contagens dos diferentes isolamentos da 2ª Parte das experiências (Solo da Área do Instituto Zimotécnico)

Diluição: - 1/10.000.000

		Diluiça	0:- 1/10.00	0.000	
Isola- mentos	Tratamentos	Nº Total de (MÉD	e Colónias Ia)	Nº de Microorg (ME	s/grama de solo DIA)
		CONN- -S.C.JRVALHO	WKSMN	CONN- -S.CL.RVLHO	Wiksman
<u>J</u> Q	Vinhaça Şeco Agua	1 1 1,5	1,5 2 1	10.000.000 10.000.000 15.000.000	15.000.000 20.000.000 10.000.000
29	Vinhaça Seco Agua	170 1,5 1,5	230 2 2	1.700.000.000 15.000.000 15.000.000	20.000.000
3º	Vinhaça Geco Agua	23 <b>5</b> 1 1,5	270 1,5 2	2.350.000.000 10.000.000 15.000.000	2.700.000.000 15.000.000 20.000.000
710	Vinhaça Seco Agua	280 1,5 2	285 2 3	2.800.000.000 15.000.000 20.000.000	
5₽,	Vinhaça Seco Água	1,5 2,5	1 <b>7</b> 0 2 2,5	1.410.000.000 15.000.000 25.000.000	20.000.000
δ₽	Vinhaça Şeco Agua	23 2,5 1,5	34,5 3 2	230.000.000 25.000.000 15.000.000	
70	Vinhaça Ş <b>ec</b> o Agua	26,5 1 1	36 1 1	265.000.000 10.000.000 10.000.000	360.000.000 10.000.000 10.000.000
8 <b>₽</b>	Vinhaça Şêco Lgua	19,5	30 0,5 1,5	195.000.000 15.000.000	300.000.000 5.000.000 15.000.000
90	Vinhaça Şêco Lgua	22	27,5 2,5 1	220.000.000 15.000.000 10.000.000	275.000.000 25.000.000 10.000.000

Todo Col Foliago

				1	<del>-</del> 24
Isola- mentos	1 1 63 1.3 000 1.08	Nº Total de (MÉDIA		Nº de Microorgs (MÉI	s/grama de solo
		CONN- -S.CLRV.LHO	WAKSMAN	CONN- -S.CARVALHO	WAKSMAN
102	Vinhaça Seco Água	13 1 1,5	21 1,5 2	130.000.000 10.000.000 15.000.000	210.000.000 15.000.000 20.000.000
119	Vinhaça Şeco Agua	11,5 1,5 1	1 <b>7</b> 2 2	115.000.000 15.000.000 10.000.000	170.000.000 20.000.000 20.000.000

Ressalta nesses quadros o fato de haver sido efetuada a conta - gem de caixas com menos de três colónias.

Entretanto, isso foi feito para um esclarecimento razoável do enorme contraste apresentado entre os diferentes tratamentos, e porque, com diluições menores, como 1/100.000, 1/10.000, etc., poderíamos ter realizado a contagem das caixas de Petri em que tenha sido colocado ma terial dos sulcos tratados com água e dos testemunhas, mas não das dos sulcos que receberam vinhaça, pela enorme quantidade de colónias apre sentadas e, por conseguinte, da impossibilidade de ser efetuada essa contagem.

#### B - 0 pH do solo

A reação do solo tem uma influência decisiva sôbre as ativida - des dos vários microorganismos e, sôbre a distribuição da Microflora e da Microfauna no solo (WAKSMAN (38).

Um solo ácido favorece o desenvolvimento de fungos, e é distinatamente prejudicial para o crescimento de certos grupos de bactérias, (por exemplo o Azotobacter), que tem como reação limite o pH 6,0. Os actinoumes são também inhibidos em seu crescimento quando o acidez do solo é maior que 4,8. A grande maioria dos microorganismos oferece um limite máximo de tolerância, tanto para a acidez, como para a alcalinidade, limite êsse que está compreendido entre os seguintes números:-

méximo de acidez - 4,2 - 4,4 máximo de alcalinidade - 8,8 - 9,2

O limite considerado ótimo para a maior parte dos miceoorganis mos está entre o pH 6,0 e 8,0.

É um fato reconhecido o que a vinhaça, apesar de ácida, eleva o pH dos solos, diminuindo sua acidez natural, e chegando por vezes a alcalinizá lo (1).

Em nossas pesquisas comprovamos mais uma vez essa assertiva, encontrando assim um ambiente ótimo para o desenvolvimento da quasi

Town of Judge

totalidade dos microorganismos nos solos tratados com vinhaça, conforme veremos em descrição abaixo.

Na primeira parte das experiências, anotamos somente o pH inicial, antes de serem efetuados os tratamentos, e o pH final, ao término das últimas contagens. Os resultados foram os seguintes:-

	sulcos	que	iriam receber vinhaça	*******	4,78
pH inicial	ti	tt	" " água	economic	4 <b>,</b> 83
pri minoran	11	11	funcionariam como tes- temunhas	ğtanlikird	4,80
	sulcos	que "	receberam vinhaça	econolicoro econolicoro	6,04 4,82
	· <b>11</b>	17	funcionaram como testemunhas		4,80

Já na segunda parte, o pH foi anotado em cada vez que se procedia a uma colheita de amostras. Assim sendo, como as amostras foram em número de onze, igual número de determinações da reação do solo tivemos, como vemos no quadro anexo:-

1) antes de serem efetuados os tramentos:-

Após serem efetuados os tratamentos:-

	Espe	cificações				I.	1o d∈	/amc	stra	as			
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	וו
Sulcos	que	${\tt receberam}$	vinhaça	6 <b>,</b> 59	7,7	7,6	7,6	7,7	7,5	7,6	7,6	7,4	7 <b>,</b> 5
tt	11	tt	água	7,00	7,00	7,2	6,9	6,9	6 <b>,</b> 8	7,00	6 <b>,</b> 9	7,00	6,8
11,	tī	funcionara testemunha		6,8	6 <b>,</b> 7	6 <b>,</b> 8	6,7	6,7	6 <b>,</b> 5	6 <b>,</b> 6	6,7	6,7	6,8

Notamos por esses quadros, que no solo da Secção de Química A-grícola, o pH inicial revelava uma acidez relativamente alta, e com a adição de vinhaça essa reação ácida diminuiu, tornando o ambiente completamente favorável ao desenvolvimento dos microorganismos.

No solo da Área do Instituto Zimotécnico, solo mais rico e de reação já conveniente para o desenvolvimento de microorganismos, notamos também, que a ação da vinhaça se fez sentir, elevando o pH inicial de 6,72 para um pH = 7,5 ao se concluirem os trabalhos.

Todo Stoffally

Como vemos então, a vinhaça confere aos solos uma alteração de de sua reação, dando-lhe assim, melhores condições para que funcione como meio de cultura para um maior desenvolvimento do número de micro-organismos, e influindo de maneira vantajosa para o crescimento das plantas superiores, como já citavam CLARK (3) e MULDER e GERRETSEN(25), em 1949 e 1952, respectivamente.

# C - Diminuição do número de microorganismos

A diminuição do número total de microorganismos nos solos tratados com vinhaça, diminuição essa que se nota pela observação dos qua dros de contagem, pode ser explicada da seguinte maneira:-

MILLAR e TURK (24), através de estudos nesse sentido, verifica ram que nem os microorganismos, nem as plantas superiores, podem se de senvolver por um período de tempo relativamente grande, sôbre condições naturais, na ausência um do outro. O crescimento de plantas superiores em solos, aumenta em muito as atividades microbianas.

Ora, elucida-se assim, a razão de tal queda na quantidade total de microorganismos por grama de solo, já que em nossas experiências não efetuamos plantação alguma, permanecendo os sulcos apenas para se proce der o estudo da ação da vinhaça como agente causal da multiplicação espatosa dos microorganismos.

## D - Influência da matéria orgânica sôbre a população do solo.

adição de matéria orgânica resulta em um aumento, traduzido em números, dos vários grupos de microorganismos do solo. Explica-se assim a razão de um solo de nossas experiências apresentar um número muito maior de microorganismos do que o outro.

O solo da primeira parte de nossas experiências era paupérrimo em matéria orgânica, ao passo que outro, apresentava uma grande riqueza nesse particular.

# E - Influência dos microorganismos na conservação do solo.

Foi observado, no decorrer de nossas pesquisas, que os diferem tes sulcos com distintos tratamentos, apresentavam-se de forma desi - gual após a queda de fortes chuvas.

Os sulcos sem tratamento e os tratados com água, mostraram-se quasi cobertos com terra, fato este motivado pela erosão.

Já o mesmo não se verificava para os sulcos tratados com vinha ça, não se notando nos mesmos quasi nenhum efeito da erosão.

L que se deveria êste fato?

The of Alaly

WAKSM.N e M.RTIN (41) estudando a importância dos microorganis mos na conservação dos solos, comprovaram que os mesmos exercem e estimulam um importante efeito de ligação sôbre as partículas finas de solo e que o gráu dessa ligação, depende dos organismos envolvidos e de sua quantidade. Estabeleceram aqueles autores, que quando matéria orgânica fresca ou decomposta é adicionada ao solo, trás como consequências modificações favoráveis nas suas propriedades físicas, com uma propensão a diminuir a erosão. Os microorganismos tendem então, a dar uma maior aderência às partículas de solo.

WAKSMAN e MARTIN (42) voltaram a seus estudos nesse sentido em 1940, utilizando-se de novas experiências, e verificaram que a ação dos microorganismos é de grande efeito para a agregação das partículas de solo, e como tal, de grande importância para a conservação dos solos e combate à erosão, fato êsse mais uma vez comprovado pelos mesmos autores no ano seguinte, através de novas pesquisas (43)

SMITH (31) e LOCHHELD (22), em 1948 e 1952 respectivamente, tornaram a pesquisar o assunto, que eferece enorme importância para a agronomia, baseados nos trabalhos de W.KSM.N e M.RTIN atrás citado, chegando às mesmas conclusões que êsses autores.

## F - Os microcreanismos como índice de fertilidade dos solos.

SORIANO (33) assegura o valor dos micróbios como índice de fertilidade dos solos, baseado em resultados apresentados pelas caixas de Petri, isto é, julga a fertilidade dos mesmos pelo número de colónias que apresentam seus isolamentos, feitos por técnica idêntica à por nós seguida. Para WINOGRADSKY (46) porém, êste processo não tem nenhuma u tilidade prática, servindo apenas para diagnosticar se um solo foi ou não, adubado com matéria orgânica.

Já WAKSMAN a STARKEY (44), que realizaram um sem número de peg quisas referentes à flora microbiana dos solos, atribuem um grande valor à estes métodos que utilizamos, e acreditam que eles dão idéia de tôda a microflora do solo, podendo servir como medida de seus estados microbiológicos.

Ora, conferindo-se grande valor ao aumento quantitativo dos microorganismos no solo, fato êsse já comprovado, temos a concluir que logicamente haverá um aumento de sua fertilidade.

MARSHALL (23) em 1951, realizou pesquisas nesse sentido, e com cluiu também, que os Métodos de Diluição e das Placas são melhores que os Métodos Microscópicos, para contagens de colónias de microorganis - mos, e que constituem uma base sólida para provar a estreita correla - ção entre o número de microorganismos e a fertilidade de um solo.

Tolog Alt Pausife

Nós sabemos que o número de microorganismos é muito grande em solos férteis; SWINGLE e WALTER (34) encontraram em tais tipos de solo 10, 20 e até 40 milhões dos mesmos por grama de solo. Estudando, ao pardessa quantidade total de microorganismos, o papel dos fungos no solo, encontrou que os mesmos têm a capacidade de produzir enzimas que hidrolisam a celulose, e que dessa forma contribuem para o processo de formação de humus.

Estudando a tabela apresentada por SARLES, FRAZIER, WILSON e KNIGHT (29), vemos as quantidades de microorganismos normalmente encontradas em solos normais.

Microorg <u>a</u> nismos	Limite minimo	Número Comum	Limite Alto
Bactérias	1.000-10.000	1.000.000-10.000.000	1.000.000.000-10.000.000.000
Actinomy- ces	100- 1,000	100,000- 1,000,000	5.000.000- 10.000.000
Fungos	1- 100	1.000- 100.000	200,000- 500,000
Total	+ de + de 1.000-11.000	+ de + de 1.000.000-11.000.000	+ de + de 1.000.000.000.000

Comparando êsses dados, com os resultados por nos obtidos no decorrer de nossas pesquisas, chega-se a conclusão de que a quantidade de microorganismos encontrada, situa-se entre os limites máximos da tabela acima citada.

Com efeito, na primeira parte de nossas experiências anotamos uma quantidade média de 1.000.000 - 2.000,000 de microorganismos por grama de solo, fato êsse que nos levou a incluir êsse tipo de solo co mo apresentando um número comum, antes de serem efetuados os tratamen tos. Porém, depois da adição da vinhaça, êsse número subiu espantosa mente no início, para depois se estabilizar ao redor dos 20 milhões no final dessa parte das experiências, o que vem a situar êsse solo como apresentando um número relativamente alto de microorganismos.

També, na segunda parte êsse aumento foi notado, crescendo tremendamente de 10 - 15 milhões de microorganismos por grama de solo, antes da aplicação da vinhaça, para, ao término das experiências apresentar uma quantidade de mais de 100 milhões.

A tabela de SARLES, FRAZIER et al, está comprovada também por trabalhos de GRAY (16) e HARMSEN (17).

Se, como cita WAKSMAN, há uma íntima relação entre o número de microorganismos e a fertilidade dos solos, a influência da vinhaça constitue algo de notável no aumento dessa fertilidade.

# G) Influência da adição de água, e das capinas.

Com respeito ao aumento quantitativo da flora microbiana dos so los, pouco valor se pode atribuir ao fator água, comparando se os resultados obtidos neste tratamento, com os obtidos no tratamento com vinhaça.

Devido ao seu poder de penetração no terreno, o efeito da dose maciça de água da experiência pouco se fez notar e, ainda por muito pou co tempo.

Com efeito, comparando-se os resultados apresentados pelos gráficos e fotografias apresentados no final desta tese, nota-se que eles se confundem com os resultados apresentados pelos sulcos testemunhas, quasi desaparecendo ambos quando comparados aos obtidos no tratamento com vinhaça.

Quanto às capinas, em número de duas para cada parte da experiência, notou-se que acarretaram um aumento do número de microorganis mos nos isolamentos próximos sub-sequentes à elas. Isto se explica pelo fato de trazerem essas capinas uma maior aeração do solo, motivada por êsses tratos culturais.

Estes aumentos, entretanto, carecem de importância principal, visto que são em quantidade mínima e, ainda mais, de muito curta duração.

Já foi por nós citada, em inúmeras vezes, no decorrer desta t $\underline{e}$  se, a importância do número de microorganismos do solo, em relação com a sua fertilidade.

Ao lado desses resultados, apresentamos, de acordo com BUCHANAN (2) algumas funções importantes dos microorganismos no solo, funções essas que são mais qualitativas do que quantitativas, mas que ressaltamos aqui porque, aumentando o número de microorganismos em um solo, suas funções crescerão também em importância.

FUNÇÕES IMPORTANTES DOS MICROORGANISMOS DO SOLO(BUCHANAN)

- 1) Transformações do Nitrogênio e seus Compostos.
  - a) Fixação do Nitrogênio livre;
  - b) Oxidação Amoniacal e de Nitritos;
  - c) Redução dos Compostos Nitrogenados;
- 2) Transformações do Enxôfre e seus Compostos.
  - a) Oxidação do Enxofre e seus Compostos;
  - b) Redução dos compostos de Enxôfre;
- 3) Transformações do Fósforo e seus Compostos.

4) Transformações do Carbono e seus Compostos.

Pelo estudo dos gráficos e das fotografias apresentados ao final desta tese, pode-se notar a diferença tremenda existente entre os sulcos tratados com vinhaça, com os dos sulcos testemunhas e tratados com água, já que entre êstes dois últimos praticamente não houve diferença.

O aumento do número de microorganismos do solo, provocado pela adição de vinhaça, é entao um fato provado e de grande importância.

Quanto à esta importância, não teremos necessidade de entrar em mais detalhes, bastando citar WAKSMAN e Starkey (44) para verificação e comprovação de tal assertiva:-

"In the cycles of transformation of elements in nature, the microbes play an important, if not a leading,  $r\hat{o}le^{it}$ .

"Economically the major interest in soils is concerned with the growth of higher plants, but, since there is such a close correlation between the development of plants and microbial activities, a comprehensive appreciation of the microbial life is of much more than aca demic interest ".

In nutrition, microorganisms have much the same requirements as higher forms of life, but their existence as single cells is much simpler than that of their multicellular associates. All microbes require for their growth and synthesis of cell substance, supplies of energy and several nutritive elements, essential for the building up of their cells, including carbon, hydrogen, nitrogen, phosphorus, potassium, sulfur, and a few others ".

### IV - CONCLUSÕES

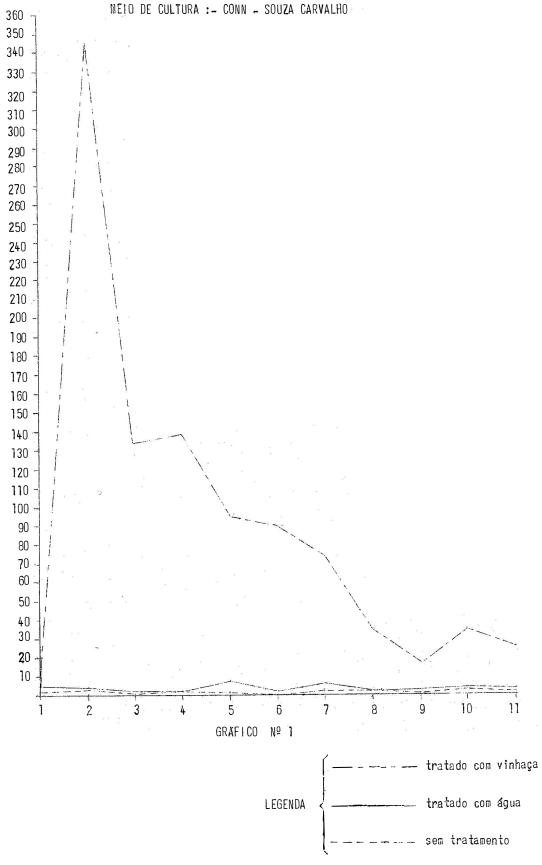
- 1 n vinhaça quando aplicada a um solo aumenta espantosamente a quanti dade de microorganismos, razão precipua do seu mais elevado índice de fertilidade.
- 2 Fica mais uma vez confirmado que o número de microorganismos que um solo apresenta é diretamente proporcional ao seu índice de fertilidade.
- 3 Quando a vinhaça é aplicada em um solo fertil a elevação do seu número de microorganismos é maior comparativamente ao resultante da aplicação de igual volume de vinhaça em solo infertil.
- 4 A água aplicada aos solos não tem, praticamente, nenhuma influência no aumento de sua microflora, caindo por terra a errônea opinião ge neralizada de que os efeitos benéficos da aplicação da vinhaça se

devem à agua que ela leva consigo.

- 5 A vinhaça aplicada aos solos, diminuindo a sua acidez natural e ele vando o seu pH inicial, torna o meio francamente favorável ao desen volvimento dos microorganismos, influindo de modo vantajoso no desenvolvimento das plantas superiores.
- 6 L vinhaça, pelos efeitos físicos que promove na estrutura do terreno diminue, notadamente, sua erosão, funcionando, desta maneira, co
  mo um agente de conservação dos solos.
- 7 As capinas, arejando os solos, aumentam o número de microorganismos, embora êste aumento seja pequeno e de curta duração.
- 8 A matéria orgânica exerce notável ação sôbre o aumento da população do solo e, consequentemente, sôbre a elevação do seu índice de fertilidade.
- 9 Os microorganismos predominantes na capa superficial que se forma após a aplicação da vinhaça nos solos, são os fungos Neurospora spp. Aspergillus spp., Penicillium spp., Mucor spp., além de vários Streptomyces spp.
- 10 -4 amostragem da superfície dos solos tratados com vinhaça não é pos sível ser adotada em virtude da impossibilidade de contagem das colónias formadas em número infinito.
- 11- A amostragem a ser adotada no estudo da microflora dos solos tratados com vinhaça deve ser feita entre 8 a 24 cms. de profundidade.
- 12 Uma reação compreendida entre pH 6,5 a 7,2 nos meios de cultura, é a mais aconselhável, visto que o limite considerado ótimo para a maioria dos microorganismos dos solos varia entre pH 6 e 8.
- 13- O Método Microscópico de observação direta para o estudo microbiológico dos solos tratados com vinhaça não pode ser usado pelas seguintes razões principais:
  - a) admite confusão na contagem das colônias;
  - b) dificulta a distinção das bactérias pequenas com as partículas do solo;
  - c) falsea os resultados pelo número surpreendentemente elevado de microorganismos por grama de solo.
- 14-0 Método de Diluição associado ao das placas de contagem é o melhor sistema para o estudo da microflora dos solos tratados com vinhaça, uma vez que facilitando a contagem das colônias diminue o êrro das observações. É preciso, porém, usar na amostragem uma quantidade de solo relativamente elevada na primeira diluição.
- 15-0 emprego da vinhaça nos solos de cultura conserva, eleva ou restaura a sua fertilidade pelo aumento notável de microorganismos que proporciona.

SOLO DA SECÇÃO TECNICA DE QUÍMICA AGRIGOLA
DILUIÇÃO :- 1/1,000.000

Fod out Camago

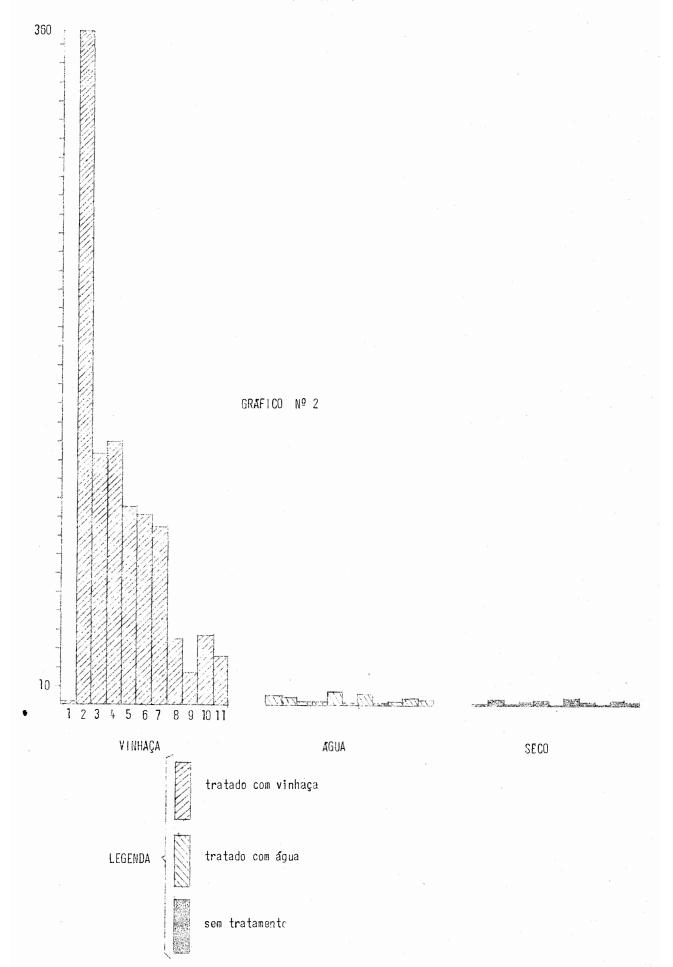


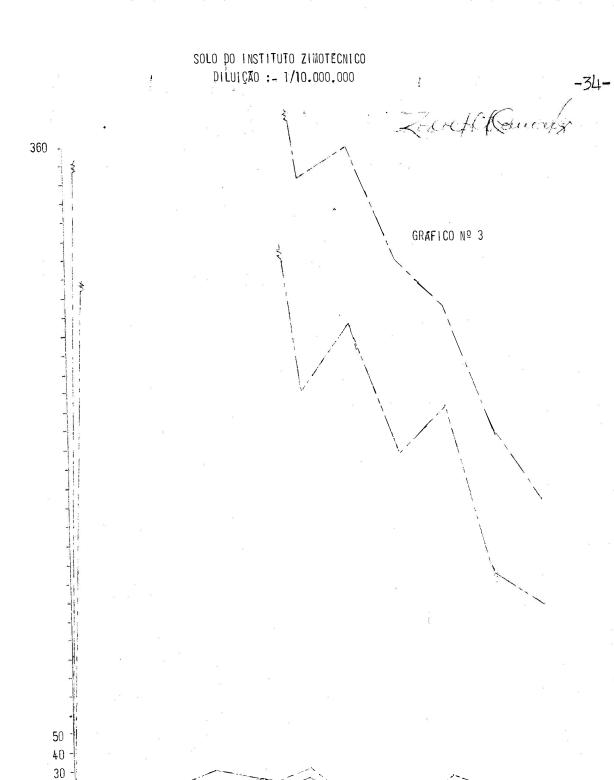
EIXO DAS ABICISSAS: - NUMERO DE CONTAGENS

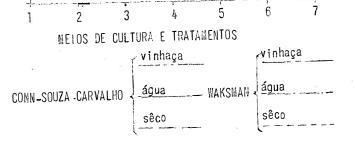
EIXO DAS ORDENADAS: - NUMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMA DE SOLO EM MILHÕES

# SOLO DA SECÇÃO TECNICA DE QUÍMICA AGRICOLA DILUIÇÃO :- 1/1.000.000 MEIO DE CULTURA :- CONN - SOUZA CARVALHO

Zorior for Toursey







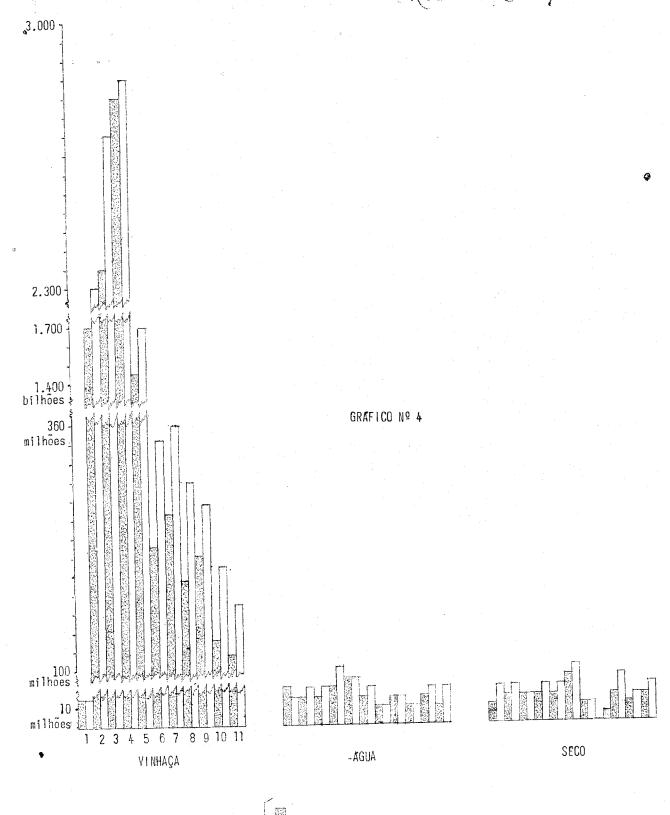
20 10

> EIXO DAS ABICISSAS:- NUMERO DE CONTAGENS EIXO DAS ORDENADAS:- NUMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMA DE SOLO EM MILHÕES

11

10

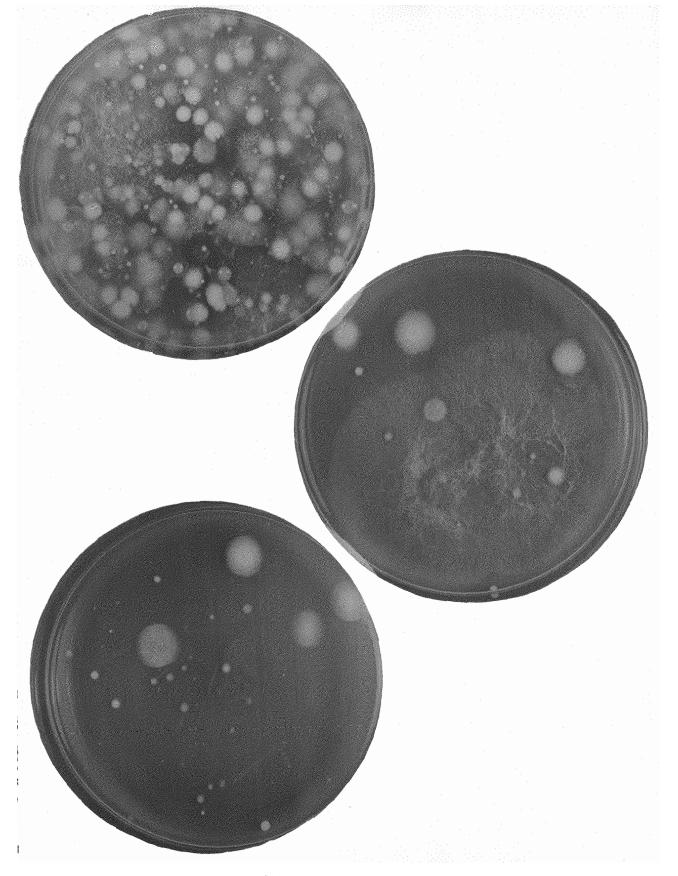
g



CONN - SOUZA CARVALHO

AGAR DE WAKSMAN

MEIOS DE CULTURA <



Solo da Secção Técnica de Química ngrícola
Diluição :- 1/100.000

Placa superior :- solo tratado com vinhaça

Placa central :- solo sem tratamento

Placa inferior :- solo tratado com água

Meio de cultura :- Conn-Souza Carvalho



Solo do Instituto Zimotécnico Diluição: - 1/10.000.000

Placas superiores :- solo tratado com vinhaça

Placas centrais .- solo tratado com agua

Placas inferiores :- solo sem tratamento

Meio de cultura :- Agar de Waksman

Todol Stanger

#### V-BIBLIOGRAFIA

- 1. ALMEIDA, J. R. de 1952 - O problema da vinhaça em São Paulo. Instituto Zimotécnico, publicação nº 3.
- 2. BUCHANAN, R. E. e BUCHANAN, E. D.
  1951 Bacteriology. Fifth edition. New York, Macmillan. p.421-435.
- 3. CLARK, F. E.

  1949 Soil microorganisms and plant roots. Advances in agronomy 1:241-288.
- 4. CONN, H. W. e CONN, H. J.
  1926 Bacteriology. Third edition. Baltimore, Will
  iams & Wilkins. p.165-208.
- 5. CONN, H. J.
  1948 The most abundant groups of bacteria in soil.
  New York State agricultural experiment satation, journal
  paper 766:257-273.
- 1932-1933 The Cholodny technic for the microscopic study of the soil microflora. Zentralblatt furBakteriologie..., II. Abt. 87:233-239
- 7.

  1927 A bacteriological study of a soil type by new me thods. Soil science 25:263-272.
- 8. COOK, R. C.
  1920 Media for soil bacteria. Soil science 1:153163.
- 9. CORBET, A. S.

  1934 Studies on tropical soil microbiology: II. The bacterial numbers in the soil of the Malay Peninsula.

  Soil science 38:407-416.
- 10. CUNNINGHAM. A.

  1947 Practical bacteriology: an introductory course for students of agriculture. Third edition. Edinburgh, Oliver & Boyd. p.164-171.
- 11. FRED, E. B.

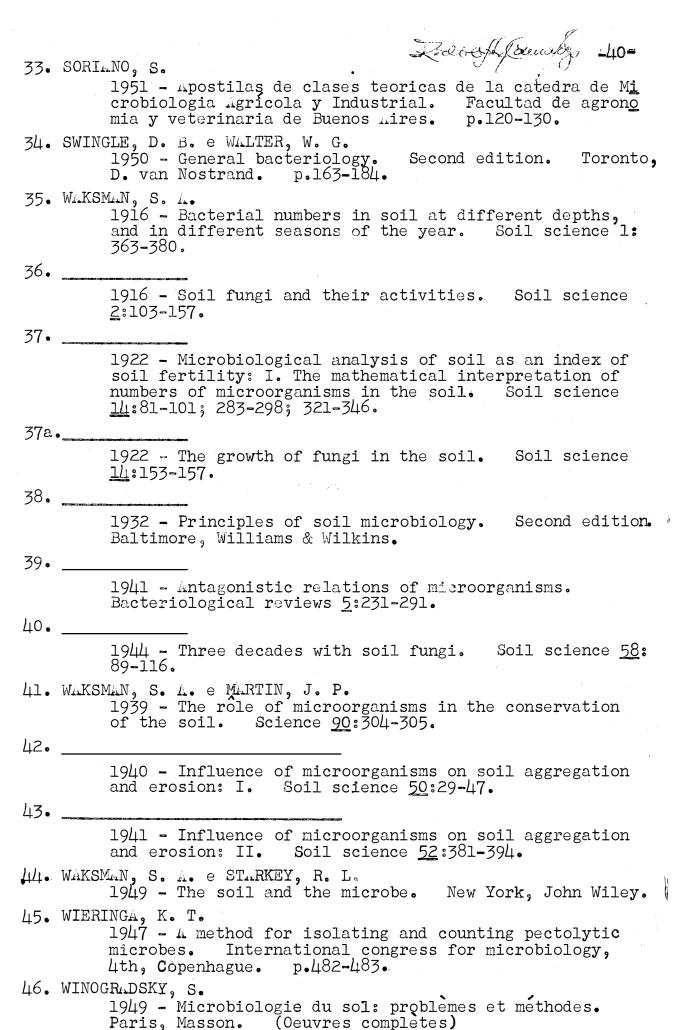
  1916 Laboratory manual of soil bacteriology. Phila
  delphia, Saunders. p.19-20.
- 12. FRED, E. B. e WAKSMAN, S. A.
  1928 Laboratory manual of general microbiology. New
  York, McGraw-Hill. p.87-139.
- 13. FROBISHER, M., Jr.

  1950 Fundamentals of bacteriology. Fourth edition.
  Philadelphia, Saunders. p.599-615.
- 14. GILMAN, J. C.
  1950 A manual of soil fungi. Ames, The Iowa State college press.
- 15. GILTNER, W.
  1916 Laboratory manual in general microbiology. New York, John Wiley. p.242-284.
- 16. GRAY, P. H. H.

  1947 Microbial activities in podsol soils en Eastern
  Canada. Antonie van Leeuwenhoek 12:59-64.

Jodos St. Comark

- 17. HARMSEN, G. W. 1939-1940 - The influence of the methods of sampling on the accuracy of the determination of bacterial numbers in the soil. Antonie van Leeuwenhoek 6:178.
- 18. JAMES, N. 1947 - Effect of responsiveness of bacteria in soil to environment on the accuracy of plate count data. Interna tional congress for microbiology, 4th, Copenhaque. p485-486.
- 19. JONES, P. C. T. e MOLLISON, J. 1947 The estimation of the number of microorganisms in soil by direct examination. International congress for microbiology, 4th, Copenhague. p.461-463.
- 20. KUBIENA, W. e RENN, C. E. 1935 - Micropedological studies on the influence of different organic compounds upon the microflora of the Zentralblatt für Bakteriologie..., II. Abt. <u>91</u>:267**-**292.
- 21. LECLERG, E. L. e SMITH, F. B. 1927 - Fungi in some Colorado soils. Soil science 25: 433-441.
- 22. LOCHHEAD, A. G. 1952 - Microorganisms and soil structure. Annual review of microbiology 6:185-206.
- 23. MARSHALL, M. S. 1951 - Laboratory guide in elementary microbiology. Se<u>c</u> ond edition. Philadelphia, Blakiston. p.156-160.
- 24. MILLAR, C. E. e TURK, L. M. 1951 - Soil science. Second edition. New York, John Wiley. p.112-265.
- 25. MULDER, E. G. e GERRETSEN, F. C. 1952 - Soil manganese in relation to plant growth. Advances in agronomy 4:222-272.
- 26. ROSSI, G. e RICCARDO, S. 1927 - L'esame microscopico e batteriologico diretto del terreno agrario. Nuovi annali dell'agricultura 7:457-470.
- 27. RUSSEL, E. J. e RUSSEL, S. W. 1950 - Russell's Soil conditions and plant growth. Eighth edition. London, Longmans & Green. p.136-196.
- 28. SALLE, A. J. 1948 - Fundamental principles of bacteriology. Third New York, McGraw-Hill. p.54**7**-592.
- 29. SARLES, W. B.; FRAZIER, W.C.; WILSON, J. B. e KNIGHT, S. G. 1950 Microbiology. New York, Harper & Brothers. p.209-216.
- 30. SCHNEIDER, A. 1920 - Pharmaceutical bacteriology. Philadelphia, p.87.
- 31. SMITH, N. R. 1948 - Microbiology of soil. Annual review of microbiology 2:453-484.
- 32. SORIANO, S. 1934 - Metodo de observación direta de la microflora y microfauna del suelo en camara humeda. Revista argen tina de agronomia 1:39-48.



Zodoch Comogo

47. WYLNT, Z. N.

1921 - A comparison of the technic recommended by various Authors for quantitative bacteriological analysis of soil. Scil science 11:295-303.

48. YAO-TSENG, T.

1947 - Technique nouvelle pour l'étude directe de la microflore du sol. International congress for microbiology, 4th, Copenhague. p.463-465.



## <u>ERRATA</u>

à pag.	a linhas	onde se lê	leia-se
12	1	microcópico	microscópico
13	1	maneira espantosa espantosa	maneira espantosa
<b>1</b> 5	11	No entretanto	Entretanto
16	9	WyANT	WYANT
17	8	Tendo-se o cuidado de não se usar	Tendo-se o cuidado de não usar
20	17	alem do fato de se secar	além do fato de s <u>e</u> car-se
28	<u> 1</u>	ao par dessa	a par dessa
28 28	- 28	També, na	Também, na
20 35	Gráf•nº 4	1.400 bilhões	1,4 bilhões
	Gráf.nº 4	1.700 bilhões	1,7 bilhões
35 35	Gráf.nº 4	2.300 bilhões	2,3 bilhões
35	Gráf.nº 4	3.000 bilhões	3,0 bilhões
35 -2	8	1920	1916
38 38	8	Media for soil bacteria.	Quantitative media for the estimation of bacteria in soils.