

Nota preliminar sôbre a determinação biológica do enxofre em solos por meio de *Aspergillus niger*

E. MALAVOLTA
Secção Técnica de "Química Agrícola"

F. GALLI
Cadeira de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola

I. R. NOGUEIRA
Cadeira de Engenharia Rural

ÍNDICE

Introdução	172
Material e Métodos	173
Resultados e Discussão	173
Resumo e Conclusões	175
Introduction	176
Material and Methods	177
Results and Discussion	177
Summary and Conclusions	179
Literature Cited	180

(*) Tese aprovada na IIIª. Reunião Brasileira de Ciência do Solo (Recife, Julho de 1951).

INTRODUÇÃO

Os métodos microbiológicos para avaliação da fertilidade do solo são baseados no princípio de que os elementos nutritivos, principalmente nitrogênio, fósforo e potássio que são necessários para o crescimento normal das plantas superiores são exigidos também pelos microorganismos; então, inoculando bactérias e fungos no solo em estudo podemos, através do desenvolvimento conseguido pelos organismos, obter uma informação sobre a reserva do solo em elementos assimiláveis.

O uso de *A. niger* como indicador biológico foi primeiramente sugerido por BUTKEWITSCH (1909) na Rússia. Seu trabalho, entretanto, não recebeu atenção até 1928 quando BENECHE e SODING usaram o princípio para determinar deficiências de fósforo e potássio em solos comparando o crescimento do micélio em meio nutritivo líquido contendo quantidades conhecidas de fósforo e potássio com o crescimento verificado em meio nutritivo ao qual haviam sido adicionadas pequenas quantidades de solo. O método foi mais tarde desenvolvido em bases quantitativas por NIKLAS e colaboradores (1930, a, b, 1932, 1936) para P, K e Mg: foi verificada boa concordância entre os resultados do método de *A. niger* e o de NEUBAUER-SCHNEIDER.

O método de NIKLAS foi modificado por MEHLICH et al. (1933). No ano seguinte, MEHLICH et al. (1934) apresentaram o método da placa de *Cunninghamella* aplicável a P somente; os diâmetros das colônias de *Cunninghamella* crescendo em placas contendo quantidades crescentes de P seguem a equação de MITSCHERLICH por interpolação na qual podemos determinar a quantidade de P assimilável que o solo possui.

Em 1938, 1939-40, MULDER modificou a técnica de NIKLAS para fazer determinações quantitativas de cobre e magnésio assimiláveis dos solos.

(Para uma revisão mais detalhada da literatura, ver VAN-DECAVEYE, 1948, pp. 215-227).

A presente contribuição nos foi indiretamente sugerida pelo trabalho de RIPPEL (mencionado por WAKSMAN e STARKEY, 1931, p. 169) concernente ao rápido desaparecimento dos sulfatos durante o crescimento de *A. niger* num meio orgânico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitos alguns ensaios preparatórios para escolher o tipo e a quantidade de meio nutritivo, as quantidades de S, o período de incubação, etc. Foi selecionado o meio de MULDER (1938) levemente modificado :

Glucose	50,0 g
KNO ₃	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,933 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,05 g
ZnCl ₂ . H ₂ O	0,001 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,0026 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,001 g
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0007 g
Água destilada	1.000 ml

40 ml. de solução nutritiva eram adicionados a uma série de balões de Erlenmeyer de 125 ml. O enxofre era adicionado como Na₂SO₄.10 H₂O nas seguintes proporções : nihil, 100, 200, 300, 400 500, 600, 800, 1000, 1500 e 2000 γ calculados como S elementar. Amostras em duplicata de 2 solos bem diferentes, uma terra roxa de boa fertilidade e um solo arenoso pobre eram adicionadas ao meio nutritivo sem enxofre. As soluções nutritivas eram esterilizadas em autoclave a 105°C. durante 30 minutos. Então, a solução em cada frasco era inoculada com 0,5 ml de uma densa suspensão de esporos preparada lavando o crescimento de 5 dias de idade de 4 tubos de cultura de *A. niger* (linhagem isolada na E. S. A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, S. Paulo, Brasil). As culturas eram incubadas a 35°C. durante 5 dias. No fim desse período o micélio era colhido, lavado com água destilada e seco primeiro a 70-90°C. durante 12 horas e depois a 90-100°C. por uma hr.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela seguinte são apresentados as quantidades de S adicionadas ao meio e os pesos correspondentes do micélio observados num ensaio em duplicata :

meio nutritivo + γ S	peso do micélio sêco - mg.	
meio nutritivo + nihil	44	50
meio nutritivo + 100	234	223
meio nutritivo + 200	362	365
meio nutritivo + 300	477	479
meio nutritivo + 400	579	568
meio nutritivo + 500	640	640
meio nutritivo + 600	710	680
meio nutritivo + 800	780	783
meio nutritivo + 1000	840	824
meio nutritivo + 1500	820	800
meio nutritivo + 2000	785	770
meio nutritivo + 5 g. "terra roxa"	182	174
meio nutritivo + 5 g. solo arenoso	123	127

Tomando as quantidades de S como abcissa e os pesos do micélio como ordenadas, obtemos duas curvas que lembram claramente as curvas que se obtêm desenvolvendo a equação logaritmica de MITSCHERLICH (1930), i. é, deste tipo

$$y = [1 - 10^{-c(x + b)}]$$

onde y é o pêso de micélio conseguido com a quantidade x de S no meio, A é o máximo crescimento possível nas condições experimentais, c é o fator de eficácia, b é a quantidade de S presente na suspensão de esporos. Aplicando o método dos quadrados mínimos aos dados acima (PIMENTEL GOMES e MALAVOLTA, 1949, PIMENTEL GOMES, 1950, NOGUEIRA, 1950, PIMENTEL GOMES e NOGUEIRA, 1951), obtemos as equações :

$$y = 919 [1 - 10^{-0,00097(x + 25,441)}] \quad (1)$$

$$y = 922 [1 - 10^{-0,0010(x + 19,960)}] \quad (2)$$

que, por interpolação, dão a quantidade de S assimilável do solo desde que se conheça o pêso do micélio sêco obtido em meio nutritivo ao qual foi adicionada uma porção de 5 g de solo. (Ver Figs. 1 e 2).

A tabela seguinte mostra como a interpolação é boa.

EQUAÇÕES

$$y = 919 [1 - 10^{-0,00097(x+25,441)}] \quad y = 922 [1 - 10^{-0,0010(x+19,960)}]$$

x γ	y (mg.)		x γ	y (mg.)	
	Observado	Calculado		Observado	Calculado
0	50	50,7	0	44	41,8
200	365	363,7	200	362	369,2
400	568	563,8	400	579	574,8
600	680	691,8	600	710	704,0
800	783	773,7	800	780	785,1
1000	824	826,1	1000	840	836,0
1500	800	888,6	1500	820	895,1
2000	770	908,5	2000	785	913,6

Para quantidades de enxôfre maiores que 1000 γ , i. e., 1500 e 2000 γ há grandes diferenças entre os valores observados e calculados provavelmente devido a efeitos tóxicos das grandes quantidades de enxofre; como sabemos, a primeira aproximação da equação de MITSCHERLICH não prevê esse caso; como é lícito não esperar quantidades tão grandes de S assimilável em solos normais não tentamos a interpolação com a segunda aproximação da fórmula de MITSCHERLICH.

A diferença entre os dois valores de c calculada é desprezível de modo que a interpolação poderá ser feita com qualquer das equações, indiferentemente.

Como existem diferenças tão acentuadas no crescimento do fungo nos solos examinados e uma regularidade tão impressionante nas curvas de crescimento podemos esperar conclusões úteis comparando os dados obtidos da maneira descrita com os resultados de ensaios de vegetação, trabalho que se acha presentemente em andamento.

RESUMO E CONCLUSÕES

O crescimento de *A. niger* — medido pelo peso do micélio sêco — no meio de MULDER a que foi adicionado S em doses crescentes, segue a equação de MITSCHERLICH. Por outro lado há grande diferença no crescimento do fungo quando o S é fornecido apenas pela reserva do solo posto no meio nutritivo. Assim, há a possibilidade de se determinar por interpolação — como é feito no método da placa de *Cunninghamella* de Mehlich para fósforo — a quantidade de S assimilável que o solo possui.

PRELIMINARY NOTE ON THE BIOLOGICAL DETERMINATION OF SULFUR IN SOILS BY MEANS OF *ASPERGILLUS NIGER* (*)

INTRODUCTION

The microbiological methods for assessing soil fertility are based on the principle that nutrient elements, chiefly nitrogen, phosphorus and potassium, which are necessary for the normal growth of higher plants are also required by microorganisms; then, by inoculating bacteria, and fungi in the soil under examination we can get through the growth of the organisms information about the soil supply in readily available elements.

The use of *Aspergillus niger* as a biological indicator was first suggested by BUTKEWITSCH (1909) in Russia. His work, however, did not receive attention until 1928 when BENECCKE and SODING used that principle to determine phosphorus and potassium deficiencies in soils by comparing the mycelium growth of *A. niger* in liquid nutrient media containing known amounts of phosphorus and potassium with that obtained from liquid media to which small amounts of soil were added. The method was later developed by NIKLAS et al. (1930-a, b) and NIKLAS and POSCHENRIEDER (1932, 1936) for the quantitative estimation of available phosphorus, potassium and magnesium. NIKLAS and his co-workers found good agreement between the results from *Aspergillus niger* and NEUBAUER's methods.

NIKLAS' method was modified by MEHLICH et al. (1933). In the next year, MEHLICH et al. (1934) presented the *Cunninghamella* — plaque method for phosphorus only; the diameters of the *Cunninghamella* colonies growing in plaques containing increasing quantities of phosphorus follow MITSCHERLICH's curve; the amount of available phosphorus in a soil sample may be determined by interpolation on this curve.

In 1938, 1939-40, MULDER modified NIKLAS' technique in order to make quantitative determination of available copper and magnesium in soils.

(For a more detailed revision of the literatura, see VAN-DECAVEYE, 1948, pp. 215-227).

(*) Received for publication may, 23, 1951.

The present contribution was indirectly suggested to us by RIPPELS's work (mentioned by WAKSMAN and STARKEY, 1931, p. 169) concerning the disappearance of sulfate during growth of *Aspergillus niger* on a carbohydrate.

MATERIAL AND METHODS

Some preliminary experiments were carried out to choose the kind and quantity of nutritive medium, the amounts of sulfur, the incubation period, etc. It was finally selected MULDER's (1938) medium slightly modified as follows:

Glucose	50.0 gm
KNO ₃	5.0 gm
K ₂ HPO ₄	2.5 gm
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.933 gm
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.05 gm
ZnCl ₂ · H ₂ O	0.001 gm
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0026 gm
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.001 gm
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.0007 gm
Distilled water	1,000 ml

40 ml. of nutrient solution were added to a series of 125 ml. Erlenmeyer flasks. Sulfur was added as Na₂SO₄ · 10 H₂O in the following proportions: nihil, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 and 2000 γ calculated as elemental S. Duplicate 5 gm samples of 2 distinctive soils namely, a good "terra roxa" and a poor sandy soil were added to nutrient medium minus S. The nutrient solutions were sterilized in the autoclave at 105°C. for 30 minutes. Then, the solution in each flask was inoculated with 0.5 ml. of a heavy spores suspension prepared by washing the growth off four 5 — day-old test tubes cultures of *A. niger* (the strain was isolated in Esc. Ag. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, S. Paulo, Brasil). The cultures were incubated at 35°C. for 5 days. At the end of incubation period, the mycelium pads were harvested, washed with distilled water and dried, first at 70 to 90°C. for 12 hours and finally at 90-100°C. for one hour.

RESULTS AND DISCUSSION

In the following table are presented the amounts of S added to the medium and the corresponding weights of the dry pads from the cultures obtained in a duplicate assay:

nutritive medium + γ S	weight of the dry pads -mg.	
nutritive medium + nihil	44	50
nutritive medium + 100	234	223
nutritive medium + 200	362	365
nutritive medium + 300	477	479
nutritive medium + 400	579	568
nutritive medium + 500	640	640
nutritive medium + 600	710	680
nutritive medium + 800	780	783
nutritive medium + 1000	840	824
nutritive medium + 1500	820	800
nutritive medium + 2000	785	770
nutritive medium + 5 gm. "tera roxa"	182	174
nutritive medium + 5 gm. sandy soil	123	127

By putting the amounts of S as abscissa and the micelium weights as ordinate we get two curves clearly resembling the one obtained by developing MITSCHERLICH's logarithmic equation (1930) that is, of this type

$$y = [1 - 10^{-c(x + b)}]$$

wherein y is the actual dry weight due to the amount x of S in the medium, A is the maximum growth possible in the experimental conditions, c the so called effect factor and b the amount of sulfur present in the suspension of spores. By applying the method of least squares to the foregoing data (PIMENTEL GOMES e MALAVOLTA, 1949, PIMENTEL GOMES, 1950, PIMENTEL GOMES e NOGUEIRA, 1951, NOGUEIRA, 1950), we get the equations:

$$y = 919 [1 - 10^{-0,00097(x + 25,441)}] \quad (1)$$

$$y = 922 [1 - 10^{-0,0010(x + 19,960)}] \quad (2)$$

which by interpolation gives the amount of available sulfur in the soil sample provided the dry weight of the pads from mycelium grown in basal nutrient solution 5 gm. portion of soil is known. (See Figs. 1. and 2.).

The following table in which are placed the observed values and the calculated ones shows the goodness or fitting.

EQUATIONS

$$y = 919 [1 - 10 - 0,00097(x + 25,441)] \quad y = 922 [1 - 10 - 0,0010(x + 19,960)]$$

x γ	y (mg.)		x γ	y (mg.)	
	Observed	Calculated		Observed	Calculated
0	50	50.7	0	44	41.8
200	365	363.7	200	362	369.2
400	568	563.8	400	579	574.8
600	680	691.8	600	710	704.0
800	783	773.7	800	780	785.1
1000	824	826.1	1000	840	836.0
1500	800	888.6	1500	820	895.1
2000	770	908.5	2000	785	913.6

For sulfur quantities higher than 1,000 γ i. e., 1,500 and 2,000 γ there are great differences between the observed values and those given by interpolation probably due to some toxic effect of large amounts of sulfur on the fungus; as we know, the first approach of MITSCHERLICH's equation does not prevent this case; since we must not expect such high quantities of S in normal soils we have not tried the interpolation with MITSCHERLICH's second approach formula.

The difference between the two c values calculated is neglectable in order that for interpolating purposes one can use equations (1) and (2) indifferently.

Since there are so striking differences in the growths of the fungus in the soils examined, and a so good regularity in the growth curves from pure media cultures, it is licit to expect some useful conclusions by correlating the data obtained as described to those collected from the pots and plots experiments, a work in which we are now engaged.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Aspergillus niger growth — as measured by the dry weight of mycelium pads — in MULDER's medium with increasing amounts of S follows MITSCHERLICH's equation. On the other hand there is great difference in the growth of the fungus

when sulfur is supplied only by the soil placed in the nutritive medium. Hence, there is the possibility of determining by interpolation — as in MEHLICH's *Cunninghamella* — plaque method for phosphorus — the supply of available sulfur in soils.

LITERATURE CITED

- BENECKE, W. und H. SODING. 1928. Beitrage zum Ausbau der microbiologischen Boden analyse. Ztschr. Pflanzenernahr., Dungung, u. Bodenk. (A) 10: 129-159.
- BUTKEWITSCH, W. 1909. Die Kultur des Schimmelspilzes *Aspergillus niger* als mittel zur Bodenuntersuchung. Zhur Opytn. Agron. (Russian Jour. Landw.) 10: 136-141.
- MEHLICH, A., E. TRUOG and E. B. FRED. 1933. The *Aspergillus niger* method of measuring available potassium in soil. Soil Sci. 35: 259-279.
- MEHLICH, A., E. B. FRED and E. TRUOG. 1934. The *Cunninghamella* plaque method of measuring available phosphorus in soil. Soil Sci. 38: 445-461.
- MITSCHERLICH, E. A 1930. Die Bestimmung des Düngerbedürfnisses des Bodens, Dritte Auflage. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.
- MULDER, E. G. 1938. Over de beteekenis van koper voor den groei van planten, pp. 38-43. Diss. Landbouwhoogeschool, Wageningen, Holland.
- MULDER, E. G. 1939-1949. On the use of microorganisms in measuring a deficiency of copper, magnesium, and molybdenum in soils. Antony van Leeuwenhoek 6: 99-109.
- NIKLAS, H. und H. POSCHENRIEDER. 1932. Die Ausführung der *Aspergillus* Methode zur Prüfung auf Kali. Ernahr. Pflanze. 28: 86-88.
- NIKLAS, H. und H. POSCHENRIEDER. 1936. Zur Feststellung der Magnesia Düngesbedürftigkeit und Magnesia — Düngewirkung im Boden mittels *Aspergillus niger*. Bodenk. u. Pflanzenernahr. 1: 235-247.

- NIKLAS, H., H. POSCHENRIEDER und J. TRISCHLER. 1930-a. Eine neue microbiologische Methode zur Festellung der Düngebedürftigkeit der Boden. Ztschr. Pflanzenernähr., Dungung, u. Bodenk. (A) 18: 129-157.
- NIKLAS, H., H. POSCHENRIEDER und J. TRISCHLER. 1930-b. Die Kultur des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* zur biochemischen Bestimmung der Kali und Phosphorsaurebedürftigkeit der Boden. Ernähr. Pflanze 26: 97-103.
- NOGUEIRA, IZAIAS, RANGEL. 1950. Sôbre uma propriedade da equação utilizada para interpolação da Lei de Mitscherlich. An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" 7: 105-108.
- NOGUEIRA, IZAIAS RANGEL. 1950. A técnica da resolução das equações relativas à interpolação da Lei de Mitscherlich pelo método dos quadrados mínimos. An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" 7: 109-113.
- PIMENTEL GOMES, FREDERICO e EURÍPEDES MALAVOL-VOLTA. 1949. Aspectos matemáticos e estatísticos da Lei de Mitscherlich. An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" 6: 193-229.
- PIMENTEL GOMES, FREDERICO. 1950. A Lei de Mitscherlich e a análise da variância em experiências de adubação. In press.
- PIMENTEL GOMES, FREDERICO e IZAIAS RANGEL NOGUEIRA. 1951. Tabelas de polinômios para interpolação da equação de Mitscherlich. In press.
- VANDECAVEYE, S. C. 1948. In Diagnostic techniques for soils and crops, pp. 199-230. Publ. by the American Potash Institute, Washington, D. C.
- WAKSMAN, SELMAN A. and ROBERT L. STARKEY. 1931. The soil and the microbe. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Growth curve of Aspergillus niger with increasing amounts of Sulfur.

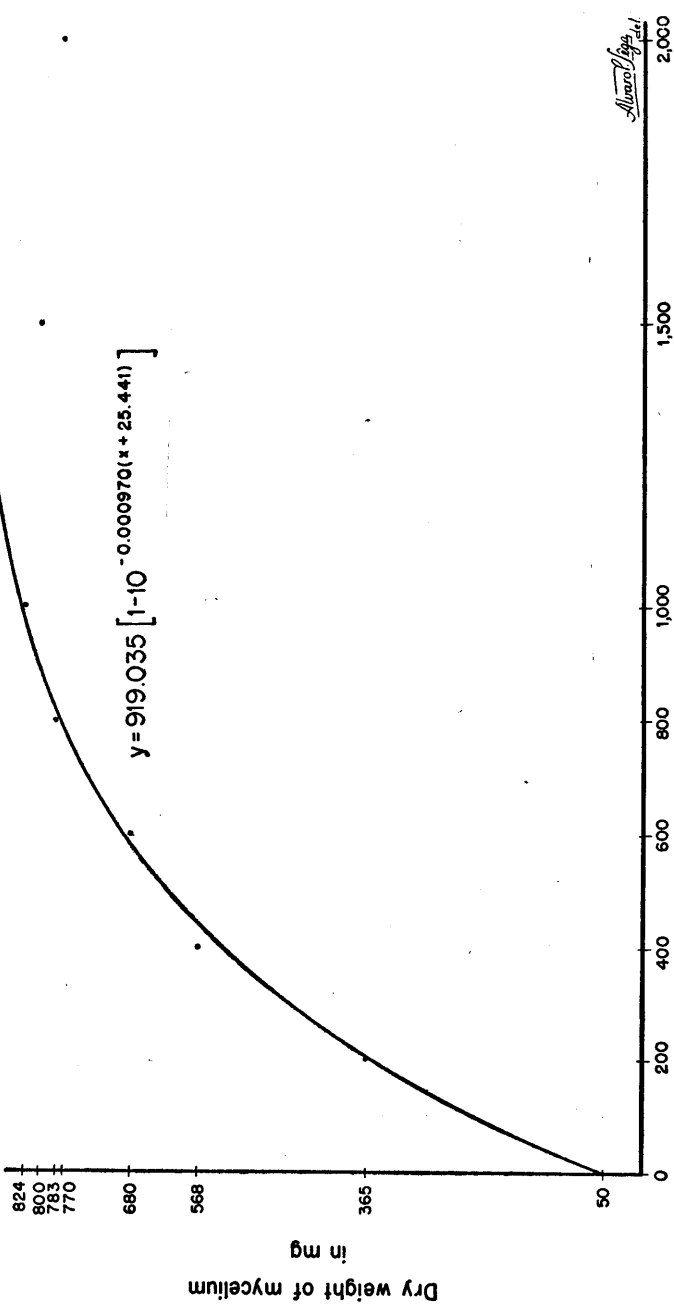
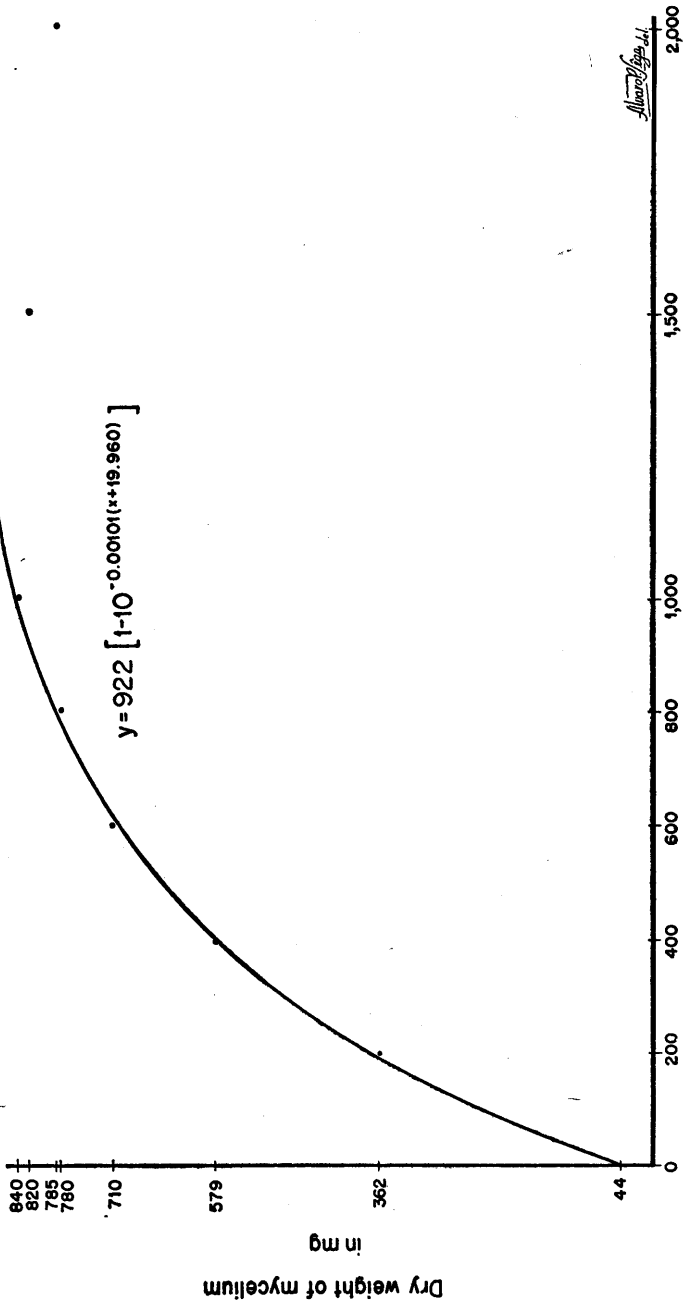


fig. 1

Alvaro de Aguiar

Growth curve of Aspergillus niger with increasing amounts of Sulfur.



Sulfur in % of elemental S
fig. 2

Aspergillus niger 44

