

OCORRÊNCIA DE FIXAÇÃO DE $^{15}\text{N}_2$ NAS GRAMÍNEAS
TROPICAIS *Digitaria decumbens* E *Paspalum notatum*

Helvécio De-Polli
ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Orientador : DR. ENEAS SALATI

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
ESALQ

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Univer-
sidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
1975

OFEREÇO

"A todos que, anteriormente, no laboratório de Ciências Ambientais do CENA, desenvolveram a metodologia de ^{15}N sem a qual este trabalho não teria sido executado".

DEDICO

*À minha esposa
Aos meus pais*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

- *Ao físico Eiichi Matsui pelos conhecimentos transmitidos com inteligência e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Eneas Salati pela orientação e condições proporcionadas.
- À Dra. Johanna Döbereiner pelas sugestões e estímulo.
- Ao Eng^o Agr^o Reynaldo L. Victoria, aos técnicos Roberto Braidoti, Willians Thadeu, Cacilda M. Cassaniga, Hermínio Hanser, José Renato de Freitas, Neuza M. Augusti e a todo o pessoal dos laboratórios de Ciências Ambientais, de Microbiologia e de Fertilidade do Solo do CENA.
- Ao pessoal do laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA, RJ. (km 47).
- Aos professores e funcionários do CENA e da ESALQ.
- Aos que fizeram a composição gráfica deste trabalho.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- A todos, pessoas e instituições, que, de uma maneira ou outra, colaboraram neste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Economia de nitrogênio na biosfera	04
2.2. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico	06
2.2.1. Sistema enzimático	06
2.2.2. Diversidade de substratos	08
2.2.3. Assimilação do N ₂ fixado na planta	09
2.3. Fixação de N ₂ por bactérias heterotróficas associadas às raízes de gramíneas	10
2.3.1. Microrganismos responsáveis	10
2.3.2. Sítio da atividade da nitrogenase.	12
2.3.3. Variações diárias e estacionais	13
2.3.4. Potencial de fixação e sua importância para agricultura tropical	14
2.4. Influência da pressão parcial de O ₂ e CO ₂ sobre a fi- xação de N ₂ na associação bactéria-gramínea	17
2.4.1. Necessidade da proteção da enzima contra o O ₂	18
2.4.2. Composição da atmosfera do solo	19
2.5. Influência da planta sobre a fixação de N ₂ na associa- ção bactéria-gramínea	21
2.5.1. Dependência da fotossíntese.	21
2.5.2. Via C ₄	21
2.5.3. Efeito das pressões parciais de O ₂ e CO ₂ sobre às plantas superiores	22
2.5.4. Ambiente na rizosfera das plantas	24
2.6. Outros fatores que podem afetar a fixação de N ₂ na as- sociação bactéria-gramínea	26

3. MATERIAL	28
3.1. Espécies de plantas utilizadas e microrganismos responsáveis	28
3.2. Solo e adubação efetuada	29
3.3. Dispositivos e aparelhos utilizados para o método de redução de C_2H_2	32
3.3.1. Sistemas para incubação de plantas	32
3.3.2. Cromatógrafos de gás	32
3.4. Dispositivos e aparelhos utilizados para o método isotópico	35
3.4.1. Câmara de incubação de plantas	35
3.4.2. Espectrômetro de massa	39
4. METODOLOGIA	
4.1. Métodos de avaliação da atividade da nitrogenase e da fixação de N_2	40
4.1.1. Método de redução de C_2H_2	41
4.1.1a. Princípios do método	41
4.1.1b. Análise cromatográfica	42
4.1.1c. Cálculos	42
4.1.2. Método isotópico	43
4.1.2a. Fracionamento isotópico	43
4.1.2b. Abundância natural de ^{15}N	44
4.1.2c. Obtenção do gás enriquecido	44
4.1.2d. Método de DUMAS modificado para preparo de amostra de plantas para análise isotópica	45
4.1.2e. Análise isotópica de amostra de gás da câmara e de planta.	46

4.1.2f. Cálculo da composição de gás da câmara e do enriquecimento das amostras de plantas	47
4.1.2g. Cálculo do teor total de nitrogênio fixado	49
4.1.3. Comparação entre os dois métodos	49
4.2. Adaptação das plantas coletadas no campo	50
4.2.1. Coleta das plantas	50
4.2.2. Adaptação das plantas em potes pequenos para incubação	51
4.2.3. Iluminação e controle térmico da câmara de incubação de $^{15}\text{N}_2$	52
4.3. Experimentos conduzidos	52
4.3.1. Seleção, com C_2H_2 , das plantas coletadas no campo	52
4.3.2. Determinação da abundância natural, em ^{15}N , das plantas	53
4.3.3. Teste, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas e destacadas	53
4.3.4. Teste, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas.	54
4.3.5. Teste, em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 , de plantas intactas	55
4.3.6. Teste, em C_2H_2 , de plantas intactas após período de pré-incubação em temperatura baixa	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Experimento 4.3.1.	57
5.2. Experimento 4.3.2.	59
5.3. Experimento 4.3.3.	61
5.4. Experimento 4.3.4.	66
5.5. Experimento 4.3.5.	68
5.6. Experimento 4.3.6.	73
5.7. Coeficiente de variação das análises.	75
6. CONCLUSÕES	77
7. RESUMO	79
8. SUMMARY	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DAS FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
01	- Sistema para incubação das plantas em C_2H_2 . Experimento 4.3.1.	33
02	- Sistema para incubação das plantas em C_2H_2 . Experimento 4.3.5.	34
03	- Câmara para incubação das plantas em $^{15}N_2$. Experimento 4.3.3. e 4.3.4.	36
04	- Câmara para incubação das plantas em $^{15}N_2$. Experimento 4.3.5.	37
05	- Sistema de câmara de incubação, em $^{15}N_2$, e reservatório de gás	38

ÍNDICE DOS QUADROS

<u>Quadro</u>		<u>Página</u>
01	- Economia de nitrogênio na biosfera	05
02	- Sistemas biológicos fixadores de nitrogênio.	07
03	- Diversidade de substrato reduzido pela nitrogenase	09
04	- Atividade da nitrogenase no sistema solo/planta de <i>Paspalum notatum</i>	12
05	- Potencial de fixação de N ₂ , sob condições de campo, em gramíneas forrageiras tropicais	16
06	- Pressão parcial de CO ₂ e O ₂ na atmosfera	20
07	- Diferenças entre plantas que apresentam a via fo- tossintética de <i>HATCH & SLACK</i> e de <i>CALVIN</i>	23
08	- Redução de acetileno por bactérias na rizosfera. .	25
09	- Efeitos da adubação, em condições de campo, na ati- vidade da nitrogenase, em raízes de <i>Digitaria de-</i> <i>cumbens</i>	27
10	- Dados de classificação e análises do solo da série Ecologia	30
11	- Fontes e concentrações dos nutrientes adicionados ao solo	31

<u>Quadro</u>		<u>Página</u>
12	- Seleção, com C_2H_2 , das plantas coletadas no campo. Experimento 4.3.1.	58
13	- Abundância natural, em ^{15}N , nas amostras de plantas utilizadas. Experimento 4.3.2.	60
14	- Resultados das análises das amostras de atmosfera da câmara de incubação dos experimentos com $^{15}N_2$.	62
15	- Incubação, em $^{15}N_2$, de plantas intactas e destacadas de <i>Paspalum notatum</i> cv. batatais. Experimento 4.3.3.	64
16	- Incubação, em $^{15}N_2$, de plantas em blocos intactos de <i>Digitaria decumbens</i> cv. transvala. Experimento 4.3.4.	67
17	- Incubação, em $^{15}N_2$ e em C_2H_2 , de blocos intactos de <i>Digitaria decumbens</i> e <i>Paspalum notatum</i> . Experimento 4.3.5.	69
18	- Incubação de plantas, em C_2H_2 , após período em temperaturas baixas. Experimento 4.3.6.	74

ÍNDICE DOS GRÁFICOS

<u>Gráfico</u>		<u>Página</u>
01 - Resultados das análises das amostras de atmosfera da câmara de incubação dos experimentos com $^{15}\text{N}_2$..		63
02 - Incubação de blocos intactos com plantas em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 . Experimento 4.3.5.		70

1. INTRODUÇÃO

A biosfera possui um grande número de organismos com habilidade em incorporar o nitrogênio atmosférico aos componentes metabólicos. Há sistemas fixadores extremamente evoluídos que tem sido utilizados há muitos anos a serviço da agricultura. Hoje, o inoculante para leguminosas é um insumo moderno de larga utilização para leguminosas de grão ou forrageira. Tem preço ínfimo e, quando bem produzido e adequadamente aplicado, tornam estas plantas auto-suficientes na nutrição nitrogenada.

Sempre almejando-se a alta eficiência do sistema citado acima, a pesquisa biológica e agrônômica tem buscado outros organismos que possam atuar em outras plantas. Além dos trabalhos que tratam

do aproveitamento das características naturais, já existentes nos ecossistemas, há trabalhos como o de *DUNICAN et al.* (1974), entre outros exemplos, que visaram a transferência de gens responsáveis pela fixação de nitrogênio de *Rhizobium trifolii* para *Klebsiella aerogenes*.

Nos dias atuais, a necessidade de se generalizar o suprimento de nitrogênio para as plantas através de uma via biológica de aproveitamento de N_2 tornou-se premente. A crise do petróleo, que encareceu a fonte de hidrogênio utilizada na fixação industrial do N_2 , e a poluição causada pela aplicação intensiva de adubos nitrogenados, em regiões de agricultura desenvolvida, são as causas.

Duas descobertas científicas nos últimos anos vieram incentivar estes estudos. Trata-se do método da redução de acetileno para teste específico de sistemas fixadores de nitrogênio, tornando acessível aos laboratórios menos privilegiados a aplicação de uma técnica simples e sensível. A outra descoberta, ambas publicadas em 1966, foi a via fotossintética de *HATCH & SLACK* (via C 4) característica de algumas gramíneas tropicais, que permite, a estas plantas, melhor aproveitamento das altas intensidades luminosas e temperaturas.

Estas descobertas científicas vieram trazer grandes perspectivas para a agricultura tropical, pois demonstraram o grande potencial em aproveitamento nas gramíneas. Os pesquisadores da fixação de N_2 sentiram-se estimulados na busca dos conhecimentos para aproveitar a capacidade de certas bactérias associadas as raízes dessas plantas em fixar N_2 . Estimulados, ainda, pela maior atividade fotossintética, que possibilita um ambiente na rizosfera mais promissor para a vida destas bactérias e sua atividade de redução de nitrogênio atmosférico, contribuindo para a produção mais econômica de proteína.

O objetivo principal deste trabalho foi confirmar, com o método de $^{15}\text{N}_2$, os resultados promissores alcançados pela equipe do laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA, RJ. (km 47) utilizando o método de redução de acetileno. Estes resultados mostraram altas possibilidades de algumas gramíneas em fixar N_2 , porém, como foi utilizado um método indireto (redução de acetileno) necessitava-se confirmar estes resultados com um método direto ($^{15}\text{N}_2$).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Incluimos nesta revisão aspectos gerais do ciclo do nitrogênio para situar os problemas específicos da fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

2.1. Economia do nitrogênio na biosfera

A fonte primária deste elemento é a atmosfera que contém 79,08% por volume deste gás. Sobre um hectare da crosta terrestre existe cerca de $8,6 \times 10^4$ toneladas de nitrogênio. Este elemento não é constituinte das rochas, exceto ocluído às rochas primárias; e,

para ser utilizado pelos organismos deve ser primeiramente fixado, por alguns processos especializados, pois a tríplice ligação de sua molécula diatômica exige uma energia de pelo menos 160 kcal por mol para sua ativação (STEVENSON, 1965 e DELWICHE, 1974).

A provisão de alimentos para os seres vivos é limitada mais pela disponibilidade de nitrogênio fixado do que por qualquer outro nutriente. Dos processos de fixação de nitrogênio atmosférico cita-se fenômenos ionizantes, como as radiações cósmicas, rastos de meteoros e relâmpagos, que momentaneamente fornecem a alta energia para o nitrogênio reagir com o oxigênio ou com o hidrogênio da água (DELWICHE, 1974). Porém, os principais processos de fixação de nitrogênio são os industriais e os através da ação enzimática de alguns organismos especializados.

Apresentamos o Quadro 1 que mostra o balanço geral do nitrogênio.

QUADRO 1 - Economia do nitrogênio na biosfera^a.

P r o c e s s o	(10 ⁶ ton/ano)	
	Adições	Perdas
Fixação biológica	54,0 - 175,0	-
Fixação industrial	30,0	-
Fixação atmosférica	7,6	-
Adição juvenil	0,2	-
Desnitrificação	-	83,0
Para sedimentos	-	0,3
T o t a l	91,8 - 212,8	83,3

^a Adaptado de DELWICHE (1974) e QUISPTEL (1974).

2.2. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

Entre todos os microrganismos fixadores de N_2 na natureza há um potencial de importantíssima magnitude estimando-se, conforme visto no Quadro 1, a quantidade anual de fixação via biológica no globo em 54 a 175 bilhões de toneladas.

Em termos de agricultura, no atual estágio científico, as leguminosas tem contribuído em maior escala para a aquisição do nitrogênio. Sem dúvida nenhuma a simbiose *Rhizobium*-leguminosa é uma associação extremamente evoluída, fixando em termos globais cerca de 55 - 140 kg de N_2 /ha.ano (QUISPEL, 1974), porém sabe-se que valores bem mais altos podem ser obtidos.

Outras associações, porém, tem mostrado evidências animadoras e vislumbram a possibilidade de desempenhar um grande papel na agricultura moderna a prazo não muito distante.

Apresentamos no Quadro 2 os diversos sistemas fixadores de N_2 que compõem esta tão importante atividade biológica, que pode-se dizer, não perde em importância para a fotossíntese do ponto de vista da aquisição de um elemento essencial para a vida da planta (MALVOLTA, 1975).

2.2.1. Sistema enzimático

A fixação de N_2 exige um poder redutor e uma fonte de energia (ATP). O termo nitrogenase é usado para denominar o sistema enzimático responsável pela redução do N_2 .

QUADRO 2 - Sistemas biológicos fixadores de nitrogênio atmosférico^a.

Associação	Hospedeiro	Microrganismo
Simbiótica Nódulos radiculares	leguminosas	<i>Rhizobium</i>
	<i>Alnus, Ceanothus, Casuarina</i>	-
	<i>Cycadales</i>	Algas azuis-verdes
Nódulos foliares	<i>Psychotria, Ardisia</i>	algumas bactérias
	<i>Gunnera spp.</i>	Algas azuis-verdes
Menos íntima Em raízes	gramíneas (C ₄) ^b	<i>Azotobacter, Beijerinckia e Spirillum</i> ^c
	Em folhas	algumas árvores
-	fetos, hepáticas e fungos	Algas azuis-verdes
Livres	solo e água (rios, lagos e mares)	bactérias, fungos e algas azuis-verdes
	trato intestinal de mamíferos (inclusive homem)	<i>Klebsiella aerogenes</i> ^d

^a Modificado de EPSTEIN (1975).^b Via fotossintética de HATCH & SLACK.^c DÖBEREINER & DAY (1974a).^d BERGERSEN & HIPSLEY (1970).

Atualmente esta estabelecido que a nitrogenase consiste de duas proteínas: Fe proteína também chamada azoferredoxina, componente II ou azofer e a Mo-Fe proteína também chamada molibdo-ferredoxina, componente I ou azofermo. A proteína individualmente não cataliza nenhuma reação e não pode ser chamada de enzima (*LJONES, 1974*).

A amônia é o produto da redução, pela nitrogenase, a partir do N_2 . A equação química pode ser assim descrita:



O valor de n é variável. A estequiometria entre a hidrólise do ATP e a transferência de elétrons durante o processo, tem sido sujeita a controvérsias. A maioria dos trabalhos demonstram que 4 a 5 moléculas de ATP são exigidas por cada par de elétrons transferidos, ou seja, 4-5 ATP: 2 e (*LJONES, 1974*).

NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotideo) funciona como doador de elétrons em sistema aeróbico como na *Azotobacter*. É requerida a presença de azotoflavina e azotobacter-ferredoxina como transportadores de elétrons (*BENEMANN et al., 1971*).

2.2.2. Diversidade de substrato para a nitrogenase

O sistema enzimático da nitrogenase não é específico para o N_2 . Diversos outros substratos podem ser reduzidos, e, que no caso específico da redução do C_2H_2 a contribuição que tem sido dada como auxílio metodológico para a pesquisa é enorme, conforme será visto no ítem 4.1.1.

A seguir apresentamos o Quadro 3 que exemplifica o assunto.

QUADRO 3 - Diversidade de substrato reduzido pela nitrogenase^a.

Ligação quebrada	Substrato	Produto
NN	N_2	$2NH_3$
	N_3^-	N_2, NH_3
NO	N_2O	N_2, H_2O
CN	HCN	CH_4, NH_3, CH_3NH_2
	CH_3CN	C_2H_6, NH_3
	CH_3NC	$CH_3NH_2, CH_4, C_2H_6,$ C_2H_4, C_3H_8, C_3H_6
	CH_2CHCN	C_3H_6, NH_3, C_3H_8
CC	C_2H_2	C_2H_4
-	$2H^+$	H_2

^a Simplificado de *HARDY et al.*, (1971).

2.2.3. Assimilação do N_2 fixado na planta

A sequência de eventos que conduz o nitrogênio gasoso livre ao intermediário "chave", não é completamente conhecida. Este intermediário é o composto que representa o fim da reação de fixação e o começo da assimilação do nitrogênio gasoso em um esqueleto de

carbono orgânico. Embora, o papel tenha sido atribuído a outros compostos não há dúvida que o intermediário "chave" é a amônia (EPSTEIN, 1975).

Se *Azotobacter* ou nódulos destacados de leguminosas são expostos ao N_2 marcado com ^{15}N por um curto período de tempo, o primeiro composto orgânico a adquirir uma elevada concentração de ^{15}N é o ácido glutâmico (CONN & STUMPF, 1972).

2.3. Fixação de N_2 por bactérias heterotróficas associadas às raízes de gramíneas

2.3.1. Microrganismos responsáveis

Azotobacter, *Beijerinckia* e *Dexia* representam três importantes gêneros da família *Azotobacteriaceae*, bactérias gram negativas, que tem habilidade em fixar nitrogênio em vida livre, embora sejam favorecidas quando na rizosfera ou na superfície das raízes das plantas.

Azotobacter foi isolada e descrita pela primeira vez em 1901 por BEIJERINCK. Duas espécies foram estudadas por este autor, *A. chroococcum*, ocorrendo principalmente em solos de pH neutro e alcalino e *A. agilis*, organismo aquático. Em anos subsequentes, diversas outras espécies do grupo *Azotobacter* foram descritas: *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis* e *A. macrocytogenes* (MULDER & BROTONEGORO, 1974). No Brasil tem sido estudada há muito tempo (DÖBEREINER, 1953 e GALLI, 1956) e foi isolada e descrita por DÖBEREINER (1966) da rizosfera de *Paspalum* spp. a bactéria *A. paspali*.

Ao lado do gênero *Azotobacter* existe o gênero *Beijerinckia* com as espécies *B. indica* e *B. mobile*. No Brasil foi isolada e descrita a *B. fluminensis* (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958).

Do gênero *Derxia* cita-se *D. gumíosa* já estudada também no Brasil (CAMPELO & DÖBEREINER, 1970).

A distribuição destes dois últimos é mais importante nas regiões tropicais (DÖBEREINER, 1959) e que além destes organismos devem haver outros fixadores de N_2 ainda desconhecidos (DÖBEREINER, 1973).

E de fato, após esta citação, DÖBEREINER & DAY (1974a) fazendo isolamento e identificação dos microrganismos responsáveis pela fixação de N_2 na gramínea forrageira *Digitaria decumbens* cv. transvala identificou como principal responsável o *Spirillum lipoferum*. Descrito em 1925 por BEIJERINCK como bactéria fixadora de N_2 quando em culturas mistas, foi esquecido devido as dificuldades na época de isolá-la e cultivá-la.

Para a associação de *Paspalum notatum*, conforme esclarece DÖBEREINER & DAY (1974b), a primeira gramínea identificada como fixadora de N_2 , acredita-se que *Azotobacter paspali* seja a principal responsável. Esta bactéria foi isolada de 95% das amostras analisadas da rizosfera de *P. notatum* cv. batatais (DÖBEREINER, 1970) sendo encontrada com menor frequência em outros cultivares. Resultados mais recentes (NEVES & DÖBEREINER, dados não publicados) demonstraram que, além de *A. paspali*, há ocorrência também de *Spirillum* sp., se for substituído sacarose por malato no meio de cultura.

2.3.2. Sítio da atividade da nitrogenase

Conforme relata *DÖBEREINER (1973)* que a idéia clássica da ocorrência da fixação de N_2 fosse no solo, alguns resultados demonstraram que o sítio principal da atividade é diretamente associado às raízes, não sendo removido pela lavagem, e que a atividade no solo do rizoplano, solo diretamente sobre as raízes, já é muito menor (Quadro 4) e talvez possa ser atribuído a pequenas raízes removidas junto com o solo do rizoplano.

QUADRO 4 - Atividade da nitrogenase no sistema solo/planta de *Paspalum notatum* ($pO_2 = 0,04$ atm).

M a t e r i a l	nmoles $C_2H_4/g.h^a$	
Raízes com solo de rizoplano	6,44	-
Rizomas com solo de rizoplano	2,44	-
Rizomas com raízes com solo de rizoplano	8,53	-
Rizomas com raízes lavadas	7,60	-
Raízes lavadas	-	282,90
Solo de rizoplano	0,18	11,46
Solo de rizosfera	0,072	0,33

^a Primeira coluna extraído de *DÖBEREINER et al. (1973)* e a segunda de *DÖBEREINER (1973)*.

Na associação *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali* há ocorrência muito grande desta bactéria, principalmente no cultivar batatais e, pouca ocorrência, em outros cultivares, indicando uma

especificidade rara na ecologia microbiana, que seria dificilmente justificada se não houvesse estreita interrelação entre bactéria e planta (DÖBEREINER & DAY, 1974b).

Trabalhando com a gramínea *Digitaria decumbens* cv. transvala, DÖBEREINER & DAY (1974a) constataram que a fixação de N₂ não é uniformemente distribuída pelo sistema radicular, mas sim, localizado em sítios sobre raízes quase sempre maduras, parcialmente lignificadas e com muitas raízes secundárias. Na sequência de trabalho os autores fizeram preparação com TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) e verificaram precipitação de cristais vermelhos de formazan e a presença de bactérias nas células das raízes. Apesar do teste do TTC não ser específico para fixação de N₂ indica centros de elevada atividade enzimática com Eh baixo. Indicando então, uma espécie de simbiose primitiva, intracelular e sem modificações histológicas.

2.3.3. Variações diárias e estacionais

A atividade da nitrogenase não é uniforme durante todo o dia e durante as estações do ano. Atividade fotossintética, formação de exudados de raízes, intensidade luminosa, temperatura e umidade podem afetar a atividade enzimática.

Durante o ciclo diário DÖBEREINER (1973) relata que no período diurno observou-se atividade mínima pela manhã e aumento brusco dentro de duas após o nascer do sol e o reinício da fotossíntese da planta e diminuindo novamente no final da tarde. Durante o ciclo noturno há o aparecimento de outro pico, de menor intensidade, interpretado como devido a liberação de carboidratos durante a noite acumulados durante o dia.

Variações estacionais principalmente em decorrência de temperaturas baixas nos meses de inverno podem levar a valores extremamente baixos de atividade da nitrogenase conforme foi constatado em trabalho, efetuado com plantas coletadas em campo de *Digitaria decumbens* cv. transvala, de ABRANTES *et al.* (1975a.). O efeito da umidade, neste mesmo trabalho, não foi significativo e somente afetou a atividade da nitrogenase nas raízes quando o ponto de murchamento foi ultrapassado.

De fato, temperaturas altas foram extremamente favoráveis às bactérias espiriliformes fixadoras de N_2 , sendo a melhor temperatura de crescimento para diversas estirpes de $34^{\circ}C$ e mostrando pouco crescimento abaixo de $28^{\circ}C$ (NEVES *et al.*, 1975).

2.3.4. Potencial de fixação de N_2 e sua importância para a agricultura tropical

Os trabalhos utilizando o método do nitrogênio marcado no estudo da fixação em gramíneas são poucos.

DÖBEREINER & DAY (1974a) encontraram valores de 0,62; 1,20 e 1,12 μg de nitrogênio fixado por grama de planta em período de incubação com $^{15}N_2$ respectivamente de 7, 17 e 26 horas utilizando a gramínea *Paspalum notatum*.

RUSCHEL *et al.* (1975) trabalhando com "seedlings" de cana de açúcar encontraram incorporação de $^{15}N_2$ com valores de até 629 $\mu g/g$ de raiz seca e 815 $\mu g/g$ de folha seca em período de incubação de 30 horas.

Devido as facilidades do método da redução do C_2H_2 os trabalhos encontrados na literatura, em sua maioria, vem sendo desen-

volvidos aplicando-se esta técnica (Quadro 5).

DART *et al.* (1972a) examinaram algumas gramíneas (*Setaria anceps*, *Cymbopogum giganteus* e *Hyparrhenia rufo*) coletadas na Nigéria e constataram a atividade da nitrogenase, sobre o acetileno, nas raízes e pouca atividade no solo sendo que a adição de uma fonte de carbono fez aumentar a atividade no solo.

DÖBEREINER *et al.* (1972a) encontraram atividade da nitrogenase em raízes de cana de açúcar associadas com *Beijerinckia indica* na ordem de 5 nmoles de C_2H_4 /ha por grama de raízes, encontrando também atividade da nitrogenase em raízes de *Panicum maximum*, *Pennisetum purpureum* e *Cymbopogon citratus*.

BALANDREAU & VILLEMIN (1973) usando o método da redução de acetileno, adaptado para medidas "in situ", usando propano como gás traçador, obteve em determinações preliminares em gramíneas de savana em Lamto uma estimativa da fixação na ordem de 25 g de N_2 /ha . dia no mês de agosto. Enquanto STUTZ & BLISS (1973) também em condições de campo encontraram valores, dependendo da vegetação, de 0,072 a 2,611 μ moles de $C_2H_4/m^2 . h$.

DÖBEREINER *et al.* (1973) usando o método da redução de acetileno determinando a atividade da nitrogenase em sistemas planta-solo intactos retirados do campo ou em raízes destacadas obtiveram uma estimativa da ordem de 15 a 93 kg de N/ha . ano na associação *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali*, sendo quase toda a atividade concentrada na superfície das raízes, não sendo fixadas quantidades de nitrogênio consideráveis no solo. Na cana de açúcar associada com *Beijerinckia* houve, além da fixação na superfície das raízes, ainda fixação de N_2 no solo, somando a atividade do conjunto planta-solo até 50 kg de N/ha . ano.

QUADRO 5 - Potencial de fixação de N₂, sob condições de campo, de gramíneas forrageiras tropicais associadas com bactérias fixadoras de N₂ (valores mínimos e máximos encontrados)^a.

E s p e c i e	País	Atividade da nitrogênase (nmoles C ₂ H ₄ /h.g.)		Estimativa dos valores máximos (g N ₂ fixado/ dia .ha)		Referência
		Raízes		Solo ^c		
		Raízes	Solo	Raízes ^b	Solo ^c	
<i>Andropogon gayanus</i> (C ₄) ^d	Nigéria	15 - 270	-	302	-	DAY & DART não publ.
<i>Andropogon</i> spp. (C ₄)	Costa Marfim	50 - 380	-	425	-	BALANDREAU et al., 1973
<i>Brachiaria mutica</i> (C ₄)	Brasil	150 - 750	0	817	0	DÖBEREINER & DAY, 1975
"	"	5 - 150	-	166	-	"
<i>B. rugulosa</i> (C ₄)	Costa Marfim	100 - 140	-	157	-	BALANDREAU et al., 1973
<i>B. brachylopha</i>	"	74	-	83	-	"
<i>Bulbostylis aphyllanthoides</i>	Brasil	17 - 269	0 - 0,068	300	30	DÖBEREINER & DAY, 1975
<i>Cynodon dactylon</i> (C ₄)	Nigéria	10 - 50	-	56	-	DAY & DART, não publ.
"	Brasil	10 - 30	-	33	-	DÖBEREINER, não publ.
<i>Cyperus rotundus</i> (C ₄)	Nigéria	2	-	2	-	DAY & DART, não publ.
<i>Cyperus</i> sp. (?)	Costa Marfim	30 - 620	-	694	-	BALANDREAU et al., 1973
<i>Cyperus obtusiflorus</i> (?)	Brasil	21 - 404	0 - 0,349	452	156	DÖBEREINER & DAY, 1975
<i>Digitaria decumbens</i> (C ₄)	"	20 - 30	0 - 0,148	33	66	"
<i>Hyparrhenia rugosa</i> (C ₄)	Nigéria	30 - 140	-	156	-	DAY & DART, não publ.
"	Costa Marfim	10 - 15	-	17	-	BALANDREAU et al., 1973
" <i>dissoluta</i> (?)	Brasil	13 - 41	0 - 0,187	45	84	DÖBEREINER & DAY, 1975
<i>Melinis minutiflora</i> (C ₄)	"	20 - 299	0 - 0,148	335	66	"
<i>Panicum maximum</i> (C ₄)	Nigéria	75	-	84	-	DAY & DART, não publ.
"	Brasil	2 - 283	0 - 0,330	634	148	DÖBEREINER & DAY, 1973
<i>Paspalum notatum</i> (C ₄)	Nigéria	25 - 30	-	33	-	DAY & DART, não publ.
" <i>comersonii</i> (?)	Brasil	5 - 954	0 - 0,086	1068	38	DÖBEREINER & DAY, 1975
<i>Pennisetum purpureum</i> (C ₄)	"	60	-	67	-	DAY & DART, não publ.

^aExtraído de DÖBEREINER et al. (1975).

^bBaseado em 5000 kg de raízes/ha.

^cBaseado em 2 x 10⁶ kg de solo/ha.

^dVia fotossintética de HATCH & SLACK.

Usando metodologia semelhante com amostras de raízes, *NEVES et al.* (1973) obtiveram atividade da nitrogenase (expressa em nmoles de C_2H_4/g raízes secas . hora) de 954 para *Pennisetum purpureum*, 730 para *Brachiaria mutica*, 341 para *Digitaria decumbens*, 299 para *Panicum maximum*, 283 para *Paspalum notatum*, 269 para *Cynodon dactylon*, 41 para *Melinis minutiflora* e 29 para *Hyparrhenia rufa*.

Utilizando métodos microbiológicos, diversos autores vem relatando há alguns anos a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas (*DÖBEREINER, 1961, RUSCHEL & BRITTO, 1966, DÖBEREINER, 1966, ABD-EL-MALEK, 1971, DÖBEREINER & CAMPELO, 1971*).

2.4. Influência da pressão parcial de O_2 e CO_2 sobre a fixação de N_2 na associação bactéria-gramínea

Embora existam mecanismos de proteção ao sistema enzimático contra o O_2 , que será visto no próximo ítem, trabalhos experimentais tem demonstrado que pressões parciais de oxigênio (pO_2) elevadas afetam a atividade da nitrogenase nesses sistemas.

A pO_2 na atmosfera livre é de 0,21 atm e a do solo, embora variável, é de 0,10 - 0,18 atm, conforme medições de alguns autores (ítem 2.4.2.), porém devido aos resultados experimentais obtidas por alguns autores relatados a seguir parece existir nos microhabitats das bactérias uma pO_2 menor do que a obtida no solo livre, permitindo que, em seu nicho ecológico, haja simultaneidade de funções opostas como a atividade de redução de N_2 e a respiração das bactérias aeróbicas.

Foi demonstrato que o pO_2 ideal para o sistema de *Paspalum notatum* é de 0,04 atm e para o sistema de *Digitaria decumbens* é de 0,01 - 0,015 atm sendo, então, o *Spirillum lipoferum* mais sensível a pO_2 , por aparente falta de um mecanismo de proteção da nitrogena-

se (DÖBEREINER & DAY, 1974b). Resultados de DROZD & POSTGATE (1970) foram de $pO_2 = 0,06$ atm como o melhor para *Azotobacter chroococcum*.

Para sistemas intactos, DÖBEREINER *et al.* (1973) não obtiveram diferença entre pO_2 de 0,04 e 0,20 atm. Porém, trabalhando-se com sistemas intactos, o resultado dependerá provavelmente do rigor na evacuação a pressões menores, na troca de atmosfera.

Quanto à pressão parcial de CO_2 , esta não tem sido muito relatada como limitante do funcionamento de sistemas fixadores. Há exemplos como o de GROBBELAAR *et al.* (1971) de que pCO_2 de 0,03 atm inibiu completamente a nodulação de sistema simbióticos, porém, para o sistema de *A. chroococcum*, DALTON & POSTGATE (1969) não encontraram nenhuma inibição com fluxo de CO_2 , a pressão de 0,02 atm.

2.4.1. Necessidade de proteção da enzima contra o O_2

Para associar duas funções opostas realizadas pelos organismos fixadores aeróbicos que é a reação de redução de N_2 e a necessidade de respiração; reação de oxidação, há necessidade de um mecanismo especial.

No sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosa a leghemoglobina atende perfeitamente esta exigência. No sistema dos fixadores livres a leghemoglobina é ausente (EPSTEIN, 1975). Sendo assim, outras condições são necessárias para atender aquele duplo aspecto, como passaremos a descrever.

Conceito de proteção respiratória - Uma das características das bactérias aeróbicas como *Azotobacter* é a sua alta taxa respiratória. Isto não só demanda suprimento de elétrons, mas também muita atividade do sistema do citocromo. A larga proporção de atividade

de respiratória serve para remover o O_2 dos sítios da fixação (MULDER & BROTONEGORO, 1974).

Proteção conformacional e compartimentação - A existência da proteção conformacional para a nitrogenase, pelo que é, implica que as proteínas sensíveis a O_2 são protegidas por sua localização espacial contra o O_2 (POSTGATE, 1974). De acordo com OPPENHEIM & MARCUS (1970) a presença de membranas em *Azotobacter*, que dá proteção a nitrogenase contra o O_2 , é quase ausente se a bactéria é cres_cida em meio de cultura com suprimento de nitrogênio combinado e a nitrogenase não é formada.

Formação de muco pela bactéria - Há evidências de que a grande quantidade de muco formado ao redor das células de *Derxia gummosa* tem a função de proteção ao excesso de oxigênio (MULDER & BROTONEGORO, 1974).

2.4.2. Composição da atmosfera do solo

A composição da atmosfera do solo pode diferir em muito da atmosfera livre, devido principalmente, a atividade microbiana.

Os organismos do solo transformam compostos orgânicos a inorgânicos com produção de CO_2 , liberação de amônia, muitas vezes com consumo de oxigênio (KATZNELSON, 1970).

Em geral, a composição da atmosfera do solo em relação a atmosfera livre, contém a mesma pressão parcial de nitrogênio (0,79 atm) e a soma das pressões parciais de oxigênio e gás carbônico é aproximadamente 0,21 atm. Medidas da composição de oxigênio giram em torno de 0,18 atm, porém, valores de 0,10 atm não são raros em solos encharcados. Quanto a pressão de CO_2 , valores de 0,002 e

0,02 atm são comumente encontrados, porém, valores de 10% ou mais já foram relatados para solos encharcados (GRIFFIN, 1972).

CAMARGO *et al.* (1974), determinando a concentração de gases da atmosfera do solo, a 20 cm de profundidade encontraram os valores relatados no Quadro 6.

QUADRO 6 - Pressão parcial (atm) de CO₂ e O₂ na atmosfera.

Atmosfera	pCO ₂	pO ₂	Referência
Livre	0,00035	0,210	DAJOZ, 1973
Solo normal	0,0227 0,002 - 0,02	0,169 0,180	CAMARGO <i>et al.</i> 1974 GRIFFIN, 1972
Solo Encharcado	0,10	0,100	GRIFFIN, 1972

A concentração de CO₂ está relacionada, também, com o teor de umidade. O CO₂ é 35 vezes mais solúvel em água do que o O₂, porém 700 vezes menos abundante do que este último no ar atmosférico (0,00035 atm para 0,21 atm) segundo DAJOZ, 1973.

Outro fator que pode influir na concentração de CO₂ é a porosidade do solo. A concentração de O₂ é baixa e de CO₂ alta em poros pequenos, comparada com a de poros grandes (GRIFFIN, 1972), sendo que com a profundidade do perfil do solo também aumenta a concentração de CO₂.

A respiração de macro e microrganismos resulta em grande evolução de CO₂ na rizosfera das plantas, em relação ao solo não rizosférico (ALEXANDER, 1961), observação que deve ser levada em consideração ao interpretarmos os valores citados no Quadro 6, pois os

microhabitats dos microrganismos podem ter uma composição de CO_2 mais alta e de O_2 mais baixa do que os valores medidos, fazendo-se amostragem no solo.

2.5. Influência da planta sobre a fixação de N_2 na associação bactéria-gramínea

2.5.1. Dependência da fotossíntese

A estreita associação das bactérias com a superfície das raízes das plantas ou com o solo da rizosfera é evidenciado principalmente pelo estímulo dado as bactérias em termos de compostos orgânicos exudados pelas raízes e como estes exudados estão quantitativamente em função da fotossíntese da planta, pois, através da síntese luminosa é que se formam os primeiros compostos orgânicos.

Há de se supor que de uma forma ou de outra a fixação de nitrogênio depende em parte da fotossíntese da planta, que pode fornecer compostos energéticos para as bactérias.

Admitindo-se esta participação da fotossíntese pode-se considerar que as plantas com atividade fotossintética mais efetiva e que aproveitam melhor as intensidades luminosas, além de outras características típicas das plantas com a via fotossintética de *HATCH & SLACK* (via C_4) dão maiores possibilidades às gramíneas tropicais, em geral, na utilização da via biológica de aproveitamento de nitrogênio atmosférico.

2.5.2. Via fotossintética de *HATCH & SLACK* (C_4)

Já se sabia há alguns anos, que plantas, principalmente tropicais, como a cana de açúcar, milho e outras gramíneas tem algumas

características diferentes em relação a taxa fotossintética, anatomia foliar e outras características do cloroplastos. Subseqüentes experimentos de cinética enzimática confirmaram que nestas plantas a fixação de CO_2 se dá através do PEP (fosfoenolpiruvato), como acceptor, formando o OAA (ácido oxalacético), que se transforma em malato e asparto (HATCH & SLACK, 1970), todos com quatro átomos de carbono e dicarboxílico. Ao contrário, as demais plantas apresentam somente o ciclo de CALVIN da fotossíntese (via C_3) tendo como acceptor de CO_2 a RuDP (ribulose difosfato) formando como primeiro produto o 3-PGA (ácido fosfo-glicérico).

As plantas C_3 apresentam o fenômeno da fotorespiração, formando-se, durante o processo, ácido glicólico. Esta particularidade afeta a eficiência fotossintética destas plantas (CROCOMO, 1974).

No Quadro 7 podemos observar as características diferenciais entre plantas C_4 e C_3 .

No Brasil, OLIVEIRA *et al.* (1973) estudaram a anatomia da folha de 75 espécies de gramíneas tropicais, com o objetivo de identificá-las em relação a sua via fotossintética mediante a síndrome anatômica da coroa de células mesofílicas e entre as espécies estudadas, 72 apresentam características do grupo C_4 .

2.5.3. Efeito das pressões parciais de O_2 e CO_2 sobre as plantas superiores

Alterações na relação CO_2/O_2 pode levar a alteração na taxa de fotossíntese, de fotorespiração e de respiração das plantas, e, como a fixação de N_2 pode ser influenciada por aqueles fatores, esta também pode ser alterada para mais ou para menos.

HAVELKA & HARDY (1974) aumentaram, em muito, a fixação de

QUADRO 7 - Diferenças entre plantas que apresentam a via fotossintética de *HATCH & SLACK* (C₄) ou *CALVIN* (C₃)^a.

Característica	Sem fotorespiração	Com
Redução do carbono	esquema dos ácidos dicarboxílicos (<i>HATCH & SLACK</i>)	Ciclo de CALVIN
Aceptor de CO ₂	PEP	RuDP
Produto da carboxilação	OAA (C ₄)	PGA (C ₃)
Produção de CO ₂ em presença de luz	Aparentemente nenhuma	Alta intensidade
Ponto de compensação do CO ₂	0 - 5 ppm	30 - 100 ppm
Assimilação de CO ₂ sob luz intensa	50-70 mg CO ₂ /dm ² . h	15-35 mg CO ₂ /dm ² . h
Intensificação de assimilação de CO ₂ à luz e pouco O ₂	Não	Sim
Efeito do O ₂ (0-50%)	Nenhum	Inibitório
Efeito de alta temperatura	Estimula absorção de CO ₂	Inibe
Eficiência fotossintética	Alta	Mais baixa
Produtividade	Alta	Baixa à alta
Anatomia da folha	Mesófilo composto próximo dos feixes vasculares	Mesófilo difuso

^a Adaptado de *BIDWELL (1974) e CROCOMO (1974)*.

nitrogênio em leguminosas com o aumento da relação CO_2/O_2 , porém, neste caso, tratou-se de planta com via fotossintética C_3 .

Para as plantas C_4 este efeito provavelmente seja menor. *BIDWELL (1974)* mostra um gráfico onde o ponto de saturação de CO_2 para planta C_3 foi em torno da concentração de 500 ppm, enquanto para planta C_4 foi em torno de 200 ppm. Desta forma o aumento na concentração de CO_2 causaria pouco efeito sobre as plantas C_4 . Os resultados de *WILSON & LUDLOW (1970)* mostraram esta tendência, embora com menor diferença entre as duas plantas.

Para as plantas C_3 o teor de O_2 mais baixo pode diminuir a fotorespiração, beneficiando a fixação de N_2 . O mesmo pode não ocorrer para as plantas C_4 que tem fotorespiração, aparentemente ausente.

Outros fatores comparativos do efeito da relação CO_2/O_2 sobre plantas C_3 e C_4 podem ser exemplificados nas diferenças apontadas no Quadro 7.

2.5.4. O ambiente na rizosfera das plantas

Geralmente, aceita-se que o termo rizosfera do solo se refere a fina camada aderida às raízes após se soltar o solo frouxo e que pode ser removido por agitação. A camada superficial das raízes, o rizoplane, quando usado nos estudos dos fenômenos rizosféricos, é um indicador muito sensível dos efeitos das raízes sobre os microrganismos do solo (*KATZNELSON, 1970*).

A ocorrência de maior população de microrganismos na rizosfera em relação ao solo propriamente dito é comum e muito citada na literatura. A presença de substâncias orgânicas solúveis é a grande responsável pelo desenvolvimento de uma microflora intensa em

torno das raízes das plantas (MACURA, 1968). Os componentes comumente encontrados são açúcares, amino-ácidos, ácidos orgânicos e derivados de ácidos nucléicos.

A atividade de microrganismos fixadores de nitrogênio encontrados na rizosfera é geralmente maior do que a encontrada no solo não rizosférico, ou seja, a relação rizosfera/solo (R/S) é geralmente maior do que 1 (Quadro 8).

QUADRO 8 -- Redução de acetileno por bactérias em rizosfera de arroz^a.

S o l o	nmoles C ₂ H ₄ /g solo . h	Relação R/S ^b
<u>Dabou</u>		
Rizosférico	22,80	2280
Não rizosférico	0,010	
<u>Abengourou</u>		
Rizosférico	8,20	1640
Não rizosférico	0,005	
<u>Yamousokro</u>		
Rizosférico	13,00	1625
Não rizosférico	0,008	

^a Adaptado de RINAUDO *et al.* (1971).

^b Solo rizosférico/solo não rizosférico

Os microrganismos podem alterar os exudados por três processos: alterando a permeabilidade das células das raízes, modificando o metabolismo das raízes e modificando o próprio material liberado (ROVIRA, 1970).

As raízes não podem ser consideradas como sendo uniformemente populadas por microrganismos. Provavelmente, existem zonas com maior colonização e outras com menores densidades populacionais (ROVIRA, 1970).

2.6. Outros fatores que podem afetar a fixação de N_2 na associação bactéria-gramínea

Outros fatores de natureza variada não foram focalizadas por não interessar diretamente ao presente trabalho de dissertação, porém, serão feitos comentários sobre alguns deles sucintamente.

Adubação - Em nossas condições parece que principalmente fósforo e molibdênio devem ser suplementados para aumentar o potencial de fixação de N_2 . Evidentemente a calagem ou outros corretivos de deficiência nutricional podem vir a serem necessários. Trabalho de PERES *et al.* (1975) demonstrou a extrema ocorrência de deficiência de Mo em 41 solos do Estado do Rio de Janeiro, para os sistemas dependentes de via biológica de suprimento de N para a planta. O Quadro 9 mostra o efeito do fósforo e micronutrientes sobre a atividade da nitrogenase.

Genética da planta - A aptidão para realizar a fixação de N_2 em maior grau é função da habilidade genética da planta. BÜLOW & DÖBEREINER (1975) encontraram diferenças entre genótipos de milho variando de 313 a 7124 nmoles de C_2H_4/g raízes . hora.

Fonte de carbono - A adição de uma fonte de carbono no solo pode aumentar em muito a atividade da nitrogenase e a fixação de N_2 (DART *et al.*, 1972a e PRIMAVESI & PRIMAVESI, 1973) e poderá vir a ser uma boa prática agrícola no sentido de estimular a fixação de N_2 .

QUADRO 9 - Efeito da adubação, em condições de campo, na atividade da nitrogenase, em raízes de *Digitaria decumbens*^a.

A d u b a ç ã o	nmoles C ₂ H ₄ /g raiz . hora	
	cv. pangola	cv. transvala
K	2,83	4,65
PK	2,66	15,42
PK micronutrientes	2,24	27,61
NPK micronutrientes	1,56	10,17

^a Segundo DE-POLLI, CARNEIRO & DÓBEREINER (dados não publicados).

Teor de NH₄⁺ - O teor do íon amônio inibiu a atividade da nitrogenase em meio de cultura (PEÑA & DÓBEREINER, 1974) e no campo (ABRANTES, 1975a).

Umidade - No trabalho de ABRANTES (1975a) a umidade do solo não se demonstrou significativamente limitante da atividade da nitrogenase, exceto em valores abaixo do ponto de murchamento.

3. MATERIAL

3.1. Espécies de plantas utilizadas e microrganismos responsáveis

Foram utilizadas duas espécies de gramíneas forrageiras tropicais que possuem a via fotossintética de *HATCH & SLACK* (via C₄) segundo a classificação de *OLIVEIRA et al.* (1973).

Estas plantas foram coletadas do campo em área da EMBRAPA, Rio de Janeiro, no km 47 da antiga rodovia Rio - São Paulo.

Utilizou-se a espécie *Digitaria decumbens* Stent. (Cultivares transvala e slenderstem) e a espécie *Paspalum notatum* Flugge (cultivar batatais). A primeira estava estabelecida no campo há cerca de dois anos e a segunda há vários anos.

A coleta das plantas foi realizada conforme descrição no item 4.2.1.

Foram escolhidas estas duas espécies por serem, até a data da coleta, as mais ativas em relação a atividade da nitrogenase, nos trabalhos desenvolvidos pela equipe do laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA, RJ. (km 47).

Quanto aos microrganismos responsáveis pela fixação de nitrogênio nestas plantas fez-se referência no item 2.3.1., e, com os testes efetuados até a data do trabalho de *DÖBEREINER & DAY (1974b)*, pode-se dizer que os principais microrganismos responsáveis são *Spirillum lipoferum* para *Digitaria decumbens* e *Azotobacter paspali* e *Spirillum* sp. para *Paspalum notatum*.

3.2. Solo e adubação efetuada

Os solos onde vegetavam as gramíneas utilizadas foram classificados por *MENDES et al. (1954)* e *RAMOS et al. (1973)* como pertencentes a série Ecologia. O Quadro 10 mostra algumas características do solo.

Efetuu-se, logo após a coleta do material do campo, a adubação baseada em experiências anteriores do laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA, RJ. (km 47), nas condições apresentadas no Quadro 11.

Sete dias antes do experimento 4.3.5. fez-se outra adubação no solo com as plantas que ainda restavam com os elementos P, K e Mo na mesma base apresentada no Quadro 11.

QUADRO 10 - Dados de classificação e análises do solo da série Ecologia (horizonte A₁, 0 - 20 cm)^a.

Classificação	Sist. americano		Critério DPFS ^b		7a. aproximação		Proj. FAO/UNESCO			
	Planosol	Porosidade	Areia grossa	Areia fina	Silte	Abruptic Arenic	Dystric Planosol			
Análises físicas(%)	48	65,1	25,8	6,6	Argila	Umidade (1/3 atm)	3,8			
Análises químicas ^c	m.eq./100 g de terra									
	PO ₄ ⁼⁼	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	V%	C(%)	N(%)	C/N	pH (água)
Análises químicas ^d (após adubação)	0,12	0,11	2,6	0,4	0,2	-	0,33	0,03	11	4,9
										5,3

^aDados extraídos de RAMOS *et al.* (1973), exceto os valores P₂O₅ e Mn (°) e os valores de (°^d).

^bCAMARGO (1966).

^cTeor de P₂O₅ assimilável (Truog) inferior a 1 mg/100 g e Mn assimilável (extrator: NH₄H₂PO₄ 3N) 10,2 ppm (DÖBEREINER & ALVAHYDO, 1966).

^dAnálises efetuadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da ESALQ.

QUADRO 11 - Fontes e concentrações dos nutrientes adicionados ao solo^a.

F o n t e	Concentração do elemento (mg/kg de solo)
<u>Macronutrientes</u>	
KH ₂ PO ₄	39,89 de P
KH ₂ PO ₄	50,19 de K
CaCl ₂ . H ₂ O	46,51 de Ca
MgSO ₄	15,00 de Mg
<u>Micronutrientes</u>	
H ₃ BO ₃	0,05 de B
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	4,02 de Cu
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	5,18 de Fe
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,20 de Mo
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	2,43 de Zn

^a Não foi adicionado Mn, pois este solo apresenta níveis altos deste elemento.

3.3. Dispositivos e aparelhos utilizados para o método de redução de C_2H_2

3.3.1. Sistemas para incubação de plantas

Para o teste do sistema solo/planta, coletado com o cilindro de ferro (Experimento 4.3.1.), utilizou-se sacos de polietileno, de 7 litros, transparente à luz. Colocava-se o cilindro dentro do saco de plástico, fechando-se a extremidade aberta (boca) contra um tubo de látex de 12 mm de diâmetro externo e 2,5 mm de espessura de parede, apertando-se vigorosamente com uma braçadeira irreversível de material plástico (T & B TY-RAP). O tubo de látex tinha a extremidade externa estrangulada e a interna livre, dentro do saco. Por meio deste tubo injetava-se o C_2H_2 e retirava-se amostras de gás por meio de seringa, para análise cromatográfica (Figura 1).

Para o teste do sistema solo/planta, transplantado para o pote pequeno (Experimento 4.3.5.), utilizou-se de vasos de LEONARD invertido (Figura 2), que consiste de uma garrafa de 1 litro sem fundo dentro de um fundo de garrafa de diâmetro maior. A vedação para gases era feita com água. Pelo septo utilizado na boca da garrafa injeta-se o C_2H_2 e retirava-se amostras da atmosfera, para análise cromatográfica, por meio de seringas.

3.3.2. Cromatôgrafos de gás

Os cromatôgrafos de gás utilizados possuem ionização de chama de hidrogênio, nitrogênio como gás de arraste e coluna de Poropak N, conforme especificam *DART et al. (1972b)*.

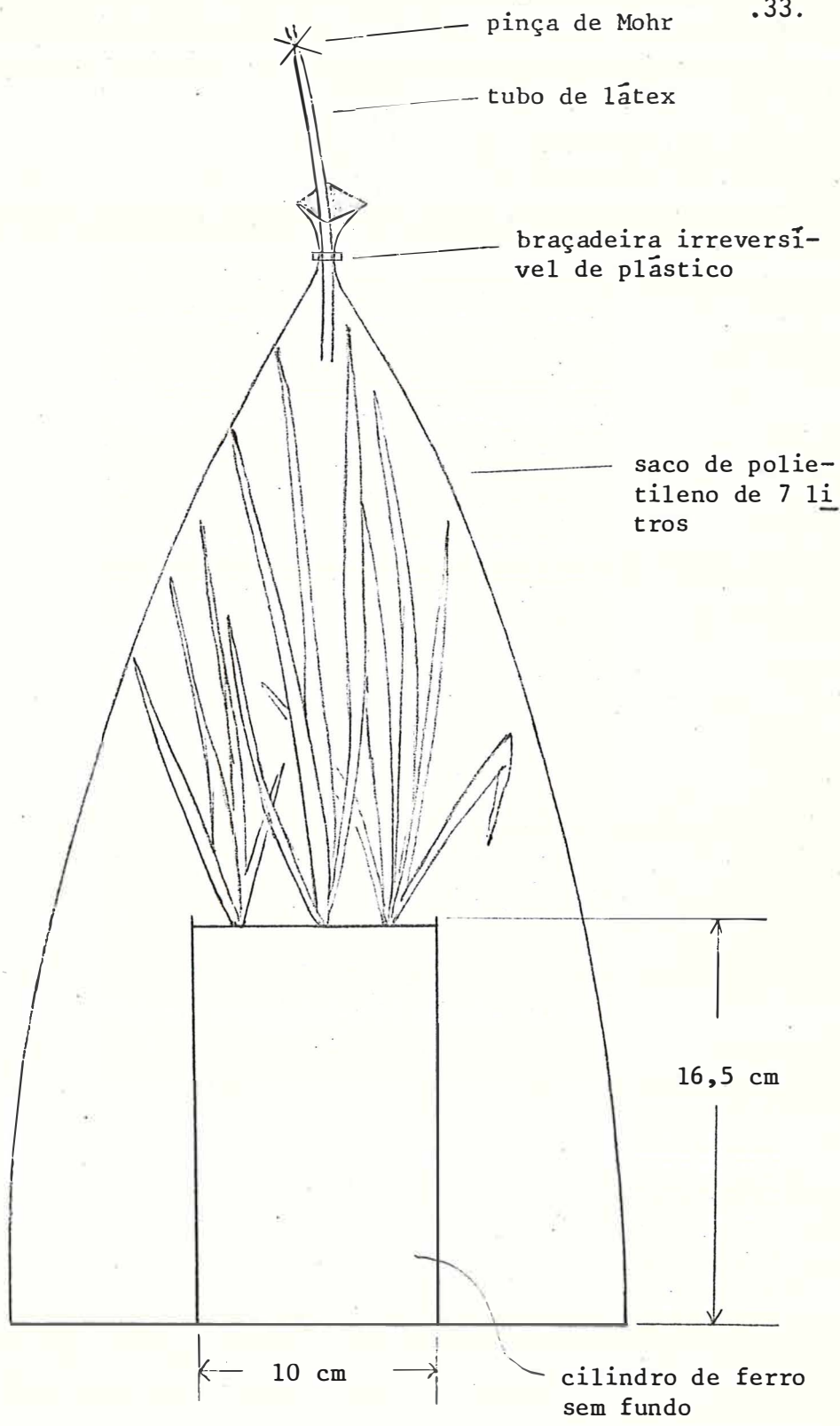


Figura 1 - Sistema para incubação das plantas, em C_2H_2 , no Experimento 4.3.1.

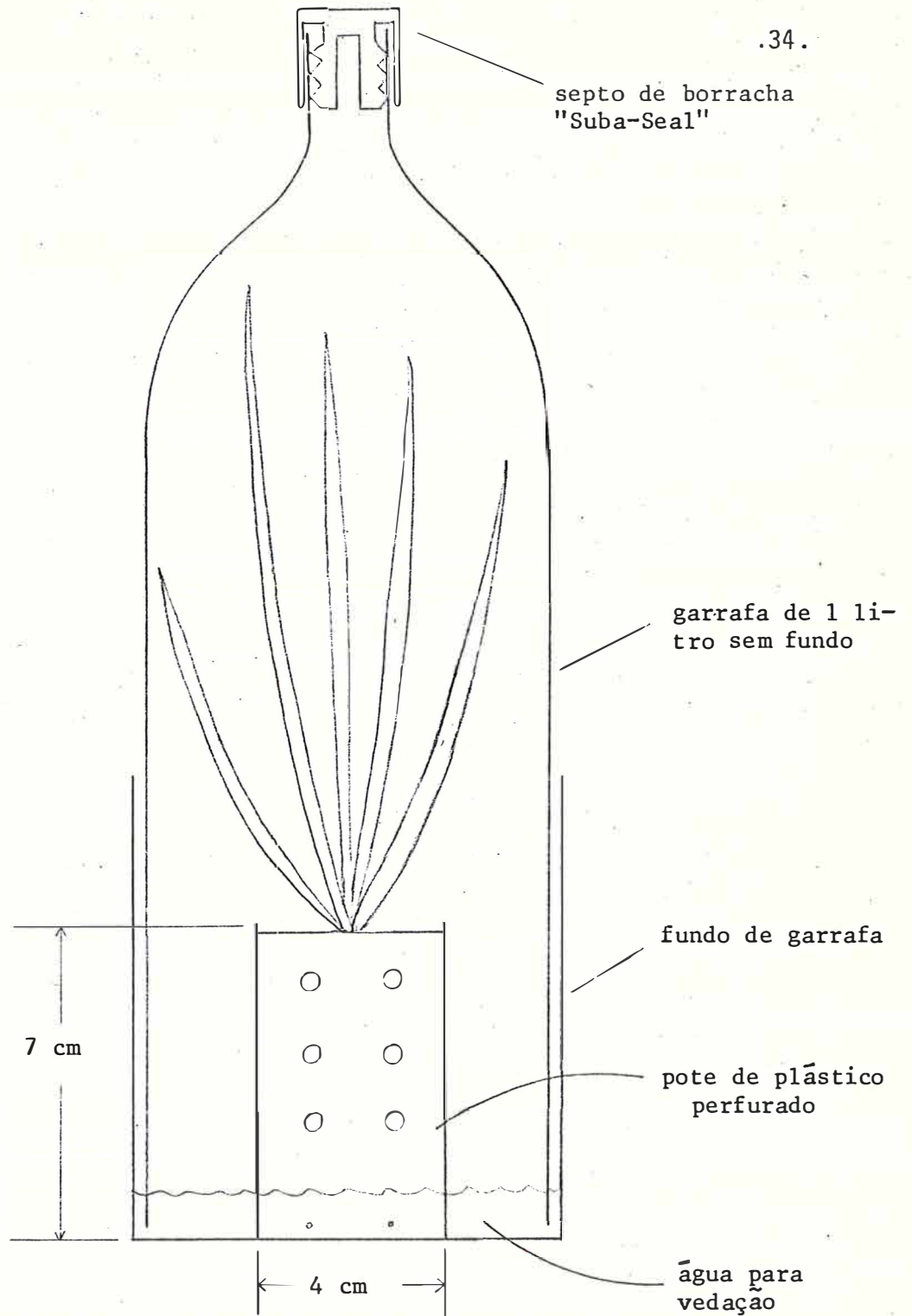


Figura 2 - Sistema para incubação das plantas, em C_2H_2 , experimento 4.3.5.

Para o Experimento 4.3.1., utilizou-se um aparelho Perkin-Elmer, modelo F-11, com temperatura de 100°C no forno. Para os Experimentos 4.3.5. e 4.3.6., utilizou-se um aparelho Beckman, modelo GC-65, com temperatura de 110°C no forno.

3.4. Dispositivos e aparelhos utilizados para o método isotópico

3.4.1. Câmaras de incubação de plantas

Foi utilizada uma câmara de vidro Pyrex (Figura 3), com capacidade para receber 4 potes pequenos de plástico, utilizada nos Experimentos 4.3.3. e 4.3.4. e uma câmara de lucite (Figura 4), com capacidade para receber 7 potes pequenos de plástico, utilizada no Experimento 4.3.5.

A câmara de lucite apresentou a desvantagem de exalar gás com odor característico do lucite.

A câmara situada entre o conjunto de lâmpadas era ligada à linha de transferência de gás, ao manômetro de mercúrio e a bomba de circulação de gás, sendo esta ligada durante a condução do Experimento (Figura 5). A finalidade do "trap" para nitrogênio líquido era eliminar possíveis contaminações de Hg, N₂O e NO e a finalidade do "trap" para água gelada era de retirar, caso necessário, o excesso de água da câmara.

Antes da passagem do gás do reservatório para a câmara, fazia-se vácuo na mesma, já com as plantas sem seu interior, da ordem de 1-5 torr. Durante o experimento mantinha-se a pressão em torno de 20 torr abaixo da pressão ambiente, que é em Piracicaba de 714 torr.

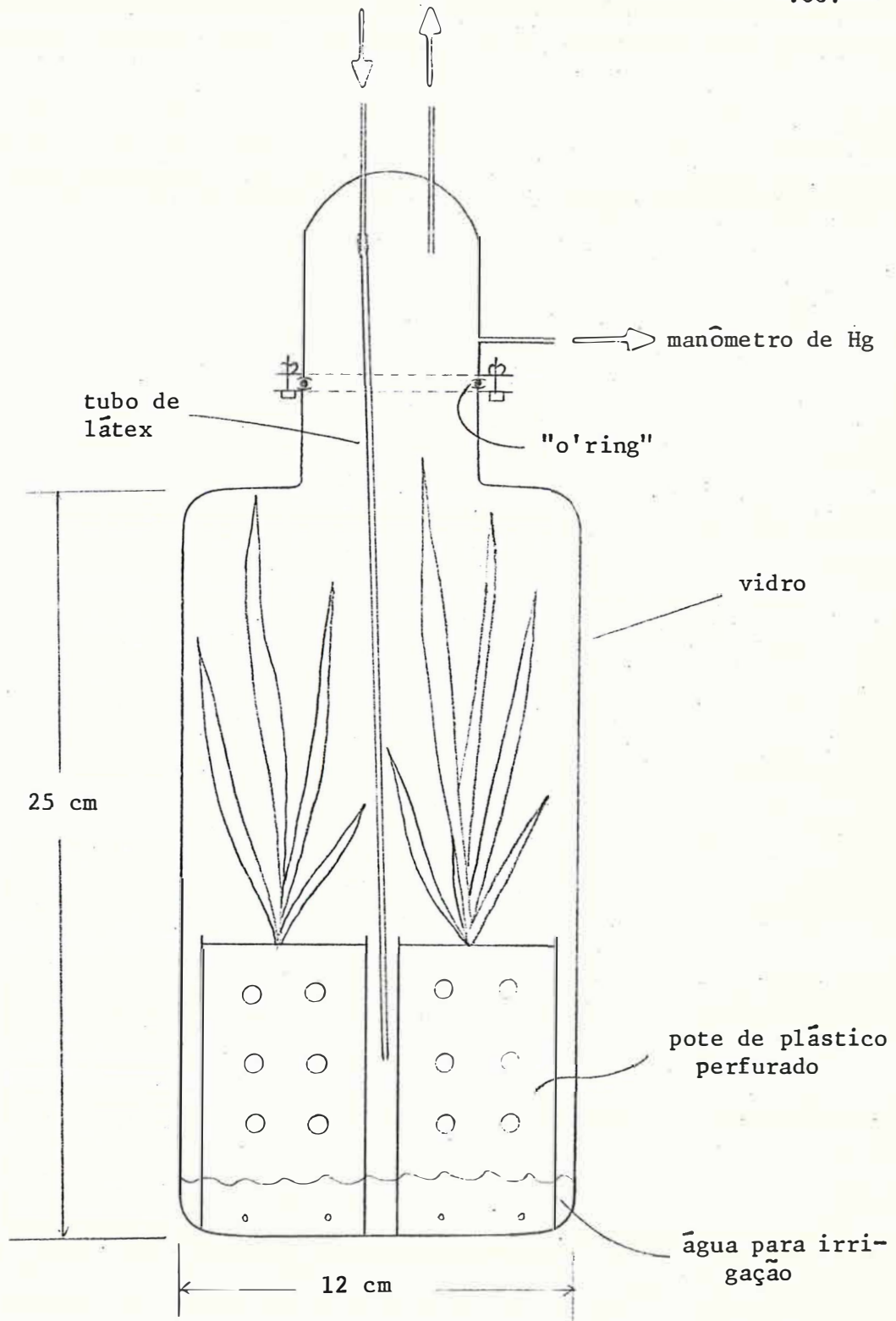


Figura 3 - Câmara para incubação das plantas, em $^{15}\text{N}_2$, nos Experimentos 4.3.3. e 4.3.4.

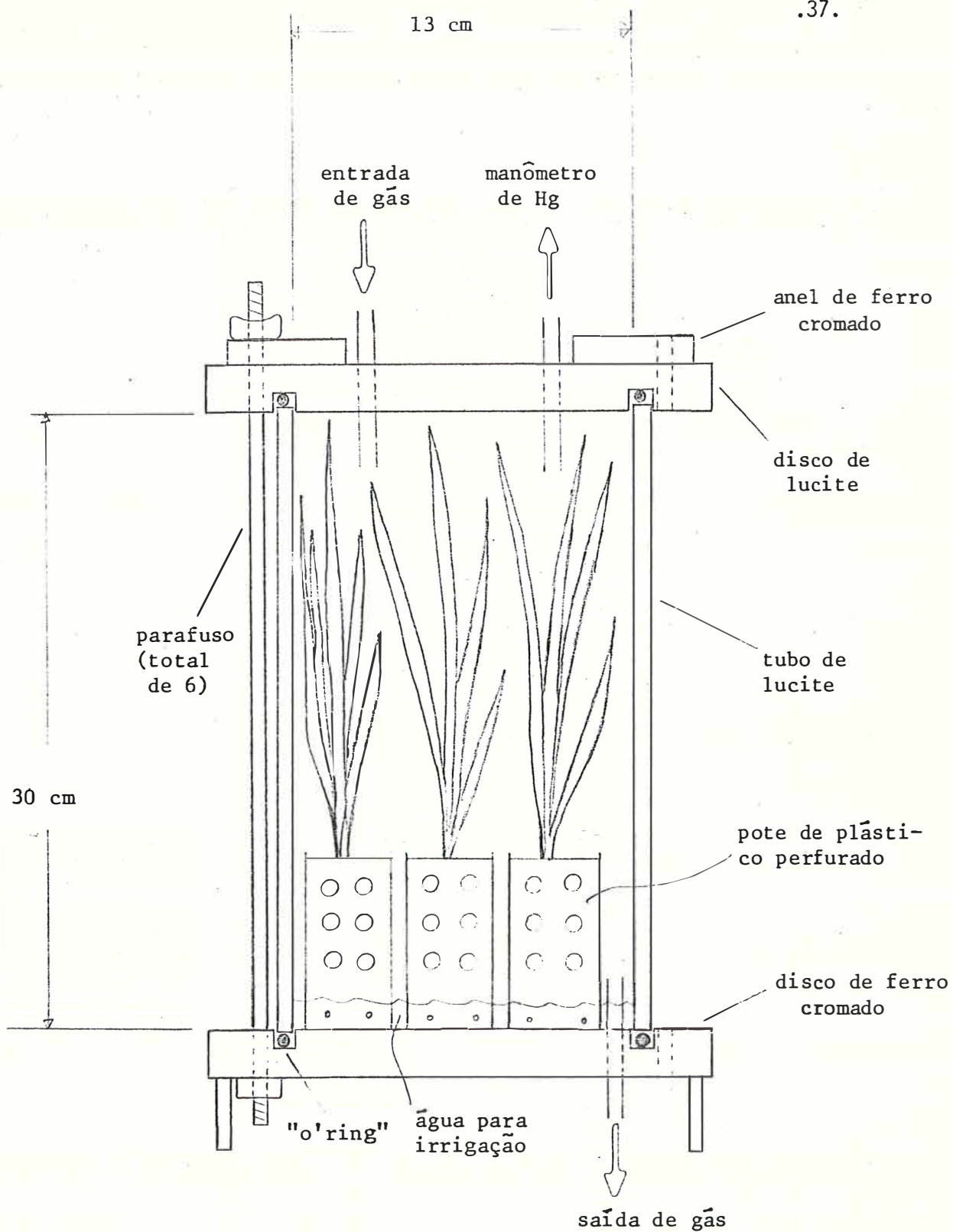


Figura 4 - Câmara para incubação das plantas, em $^{15}\text{N}_2$, no experimento 4.3.5.

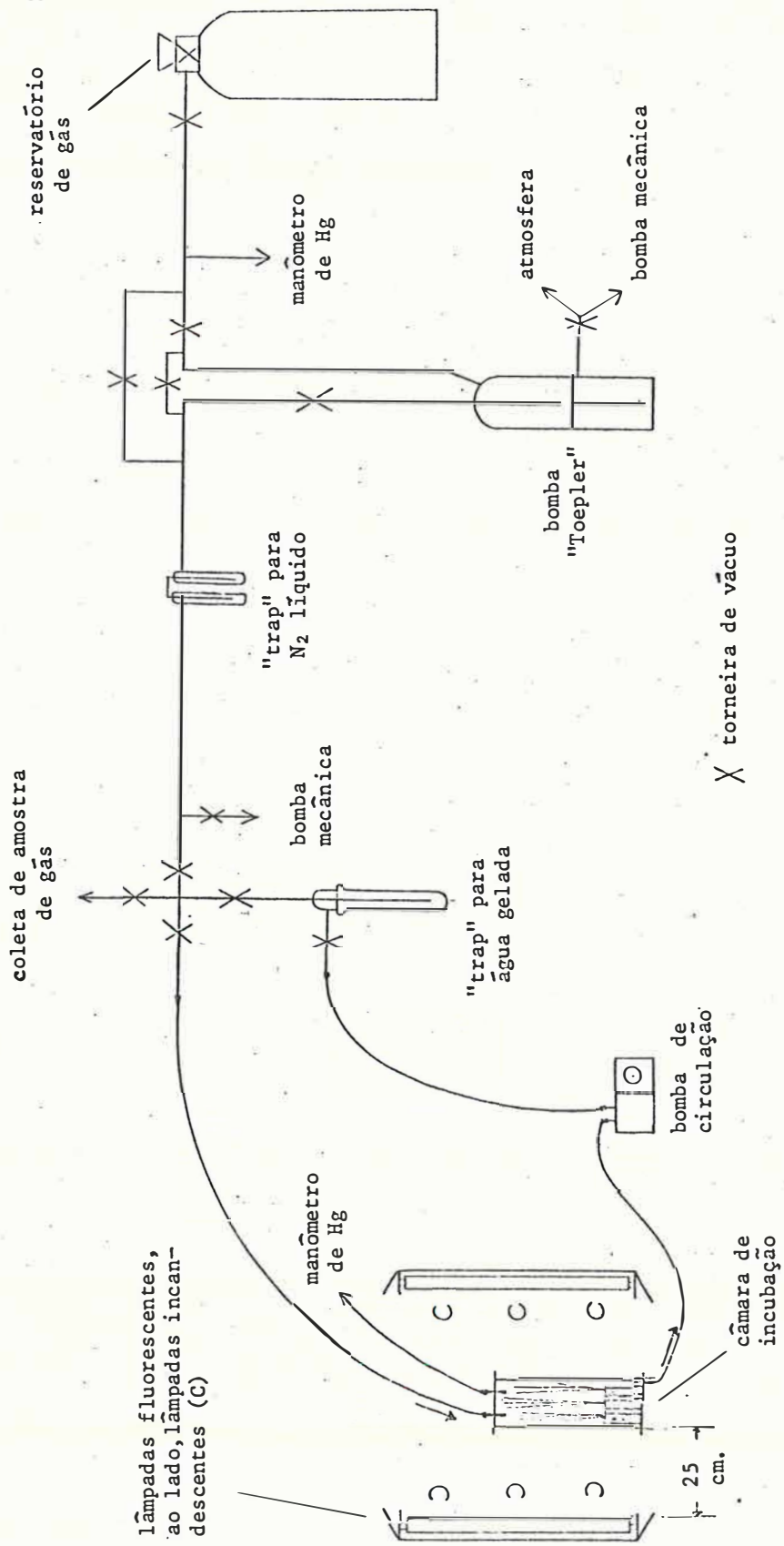


Figura 5 - Sistema de câmara de incubação de plantas, em ¹⁵N₂, e reservatório de gás utilizado nos experimentos 4.3.3., 4.3.4. e 4.3.5.

3.4.2. Espectrômetro de massa

Foi utilizado um espectrômetro de massa Varian-Mat modelo CH-4, com sistema de ionização por impacto de elétrons. Os componentes e funcionamento do sistema de admissão, da fonte de ionização, do analisador e do detector deste aparelho estão descritos em *DUCATI et al. (1974)* e *VICTORIA & SALATI (1975)*.

4. METODOLOGIA

4.1. Métodos de avaliação da atividade da nitrogenase e da fixação de N₂

Foram utilizados os métodos de redução de acetileno e o da incorporação de nitrogênio molecular marcado. De acordo com *DILWORTH (1970)* o primeiro método é mais sensível e conforme *VLASSAK et al. (1973)* o método de redução de acetileno pela simplicidade, precisão e economia transformou-se em rotina para a medida da atividade da nitrogenase. O segundo método, utilizando ¹⁵N₂, embora mais trabalhoso e oneroso, mede com maior aproximação das condições reais a fixação do nitrogênio atmosférico.

4.1.1. Método de redução de C_2H_2

4.1.1a. Princípios do método

Este método baseia-se na capacidade do sistema enzimático da nitrogenase em reduzir substratos diversos como N_2 , N_2O , HCN , CH_3CN e C_2H_2 que tem trípliques ligações em NN, CN e CC (HARDY *et al.* 1971) (Quadro 3).

As primeiras observações de que o C_2H_2 é reduzido a C_2H_4 por sistemas enzimáticos fixadores de nitrogênio foram feitas, conforme cita BURRIS (1971), por SCHÖLLHORN & BURRIS (1966) que demonstraram redução de acetileno por *Clostridium pasteurianum*, sendo este substrato inibidor da fixação de N_2 . Independentemente, DILLWORTH (1966) observou a redução de acetileno e demonstrou claramente que o produto desta redução, o etileno, não era reduzido posteriormente.

As primeiras utilizações do método de redução de acetileno, conforme cita DÖBEREINER & DAY (1974b), foram para testar atividade de nódulos de leguminosas (KOCH & EVANS, 1966) e amostras de lagos e solos (STEWART *et al.*, 1967 e HARDY *et al.*, 1968), tendo sido necessárias algumas modificações quando aplicado para associações de gramíneas.

O método constitui, então, em colocar cultura de bactéria, solo, raízes destacadas ou blocos intactos com plantas, conforme o modelo que se vai estudar, em ambiente fechado com uma pressão parcial de acetileno adequada, coletando-se após certo tempo de incubação amostras da atmosfera e analisa-se o teor de C_2H_4 , produto da redução enzimática do C_2H_2 .

4.1.1b. Análise cromatográfica

A análise é efetuada por cromatografia em fase gasosa, com coluna de Poropak N ou R e com ionização em chama de hidrogênio. A alíquota gasosa retirada da atmosfera fechada do material incubado é injetada diretamente no aparelho.

4.1.1c. Cálculos

Os cálculos se baseiam em:

Correção do volume molar ocupado pelos gases - Faz-se a correção do volume gasoso ocupado nas condições normais de temperatura e pressão (22,4 l) para as condições de temperatura e pressão local. No caso de experimentos em que só interessam os dados relativos de comparação entre tratamentos, esta correção é dispensável.

Calibração do aparelho - Injeta-se uma amostra padrão de etileno, com concentração conhecida, para se relacionar a unidade de altura do pico (cm ou mm ou a unidade do papel cromatográfico), multiplicado pela amplificação, com a concentração. Calcula-se o fator F.

Pureza do acetileno - O acetileno a ser usado deve ser analisado para ser descontado o etileno, que o acompanha como impureza (valor C).

Leitura da amostra problema - Injeta-se a amostra e faz-se a leitura (L) da altura do pico, multiplicada pela amplificação.

Relação final - Pode-se realizar os cálculos baseado na seguinte relação:

$$\frac{(L - C) \cdot V \cdot F}{P \cdot T}$$

sendo L, C e F já visto anteriormente, V = volume do frasco, P = peso do material (raiz, solo, etc.) e T = tempo de incubação.

Os resultados podem ser expressos em nano moles de C₂H₄/g.h.

4.1.2. Método isotópico

4.1.2a. Fracionamento isotópico

RANKANA (1956) cita possibilidades biológicas de fracionamento isotópico no ciclo do nitrogênio e a ocorrência de excesso ¹⁵N em vários aminoácidos naturais, sendo que, microrganismos diversos, que atuam em diferentes partes nas reações do ciclo do nitrogênio, podem usar diferentemente o ¹⁴N do ¹⁵N.

DELWICHE & STEYN (1970) encontraram valores diferentes no fracionamento isotópico por microrganismos, sendo o maior fator de fracionamento encontrado foi para a nitrificação, o fator intermediário para a desnitrificação e encontrou o fator mais baixo para a fixação de nitrogênio.

Não resta dúvida que pode haver ocorrência de fracionamento isotópico no ciclo do nitrogênio, e inclusive, na fixação biológica. Mas, conforme cita *BERGERSEN (1973)*, que a curta duração dos experimentos pode impedir que seja detectada alguma diferença. Devido, talvez, ao baixo valor do fator de fracionamento isotópico na fixação de nitrogênio, os trabalhos utilizando a técnica de ¹⁵N₂ não tem incluído correção para este efeito.

4.1.2b. Abundância natural de ^{15}N

BERGERSEN (1973) cita que a maioria dos trabalhos relacionam valores para a abundância natural de ^{15}N como 0,365 átomos %, e que, em seu laboratório tem sido encontrado valores de 0,362 a 0,368 átomos %.

RUSCHEL et al. (1975) encontraram em amostras de cana de açúcar a abundância natural de 0,369 átomos % para as raízes e 0,365 átomos % para a parte aérea das plantas.

Considerando a possibilidade de fracionamento isotópico do nitrogênio nos mecanismos biológicos e a precisão analítica de cada laboratório, evidentemente, que para cada sistema solo/planta em estudo deve-se incluir a testemunha para se obter o valor da abundância natural de ^{15}N .

4.1.2c. Obtenção do gás enriquecido

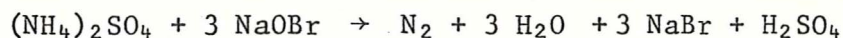
O gás de N_2 enriquecido com ^{15}N foi o mesmo que vinha sendo utilizado em outros experimentos no laboratório.

Para evitar a contaminação com gases indesejáveis de N_2O e NO marcado com ^{15}N que poderia interferir nos resultados obtidos de fixação de $^{15}\text{N}_2$, fazia-se a purificação do gás pela passagem através de "trap" de nitrogênio liquefeito que eliminaria por congelamento estas, ou outras, possíveis interferências.

Este gás foi preparado através da conversão de um sal amoniacal, contendo ^{15}N em excesso, para o gás $^{15}\text{N}_2$, através da oxidação do íon amônio com solução alcalina de hipobromito de sódio. O gás liberado no frasco da reação é transferido por meio de bomba

"Toepler" para outro recipiente.

A reação que ocorre é a seguinte:



A técnica e o preparo dos reagentes estão descritos em *TRIVELIN et al.* (1973) e *VICTORIA & SALATI* (1975).

4.1.2d. Método de DUMAS modificado para preparo de amostra de planta para análise isotópica

As plantas, após secagem à 65°C e moagem, foram preparadas pelo método via seca de DUMAS para liberação das formas de nitrogênio combinado para nitrogênio molecular (*PROKSCH, 1969*).

Utilizou-se 50 mg de matéria seca, e, em alguns casos, 100mg. Essas porções foram colocadas em ampolas especiais de vidro Pirex, com extremidade afilada, própria para ser quebrada, e para cada 100 mg de matéria seca de planta colocava-se 1,5 g de CuO e 1,5g de CaO (previamente queimado a 1000°C). Os tubos em seguida eram levados para um sistema onde se fazia vácuo melhor que 5×10^{-3} torr. Os tubos de vidro contendo as amostras e os reagentes eram fechados com auxílio de um maçarico.

As amostras, dentro do tubo de combustão, eram queimadas em forno, com aumento gradativo da temperatura até atingir 550°C, permanecendo 8 horas nesta temperatura.

A amostra após ser queimada e liberado o N₂ dentro do tubo de combustão, este era colocado dentro de um tubo de expansão com junta e torneira de vácuo e levado para um sistema onde se fazia

vácuo melhor que 5×10^{-3} torr e fechava-se o tubo de expansão. Quebrava-se a ponta afilada do tubo de combustão em seu interior e admitia-se a amostra no espectrômetro de massa (TRIVELIN *et al.* 1973).

4.1.2e. Análise isotópica de amostra de gás da câmara e de planta

As amostras de gás coletadas na câmara de incubação, em balão com junta de vácuo, e as amostras de N_2 provindas das amostras de plantas, contidas no tubo de expansão, eram admitidas no espectrômetro de massa e era feita a análise do espectro de massa das moléculas gasosas contidas no gás pela detecção da intensidade de cada espécie iônica presente.

Fazia-se a varredura do espectro da massa 12 até a massa 45 para se saber da possível existência de massas de moléculas ou fragmentos de moléculas maiores que pudessem contaminar os picos que interessam para análise. Em caso de ser observada possível contaminação, fazia-se o congelamento da amostra com nitrogênio liquefeito e admitia-se o gás não congelado.

As intensidades (I) dos íons correspondentes as massas 28 ($^{14}N^{14}N$), 29 ($^{14}N^{15}N$), 30 ($^{15}N^{15}N$), 32 ($^{16}O^{16}O$), 40 (^{40}A) e 44 ($^{12}C^{16}O_2$) foram cotados para se conhecer as pressões parciais desses gases na atmosfera da câmara. Foram usados os fatores de correção 0,98 para N_2 ; 1,10 para O_2 ; 0,95 para A e 0,995 para CO_2 com a finalidade de corrigir a intensidade correspondente a massa dos elementos registradas pelo aparelho com a pressão parcial do gás. Estes fatores foram calculados por CAMARGO (1971) para o mesmo aparelho utilizado neste trabalho.

Nas análises do gás proveniente das amostras de plantas,

após realizada a varredura de massas 12 a 45, era repetido por 8 vezes a varredura das massas 28, 29 e 32. A intensidade da massa 30 (I_{30}) não era suficiente para ser detectada e I_{32} era detectada para efeito de correção de contaminação de ar atmosférico.

4.1.2f. Cálculo da composição de gás da câmara e do enriquecimento das amostras de plantas

A composição e enriquecimento em ^{15}N do gás da câmara de incubação foi calculada através das intensidades dos íons I_{28} , I_{29} , I_{30} , I_{32} , I_{40} e I_{44} , subtraído dos seus respectivos "back-ground" (BG).

O enriquecimento foi calculado pela seguinte relação:

$$\text{átomo \% } ^{15}\text{N} = \frac{I_{29} + 2 I_{30}}{2 (I_{28} + I_{29} + I_{30})} \times 100 \dots (1)$$

As pressões parciais (em atm) dos gases da câmara foram calculadas pelas seguintes relações:

$$p \text{ N}_2 = \frac{I_{28} + I_{29} + I_{30}}{I_t} \times 0,98$$

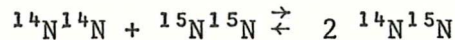
$$p \text{ O}_2 = \frac{I_{32}}{I_t} \times 1,10$$

$$p \text{ A} = \frac{I_{40}}{I_t} \times 0,95$$

$$p \text{ CO}_2 = \frac{I_{44}}{I_t} \times 0,995$$

sendo o índice "p" a pressão parcial em atm., I_p a intensidade dos íons 28, 29, 30, 32, 40 e 44 e os fatores multiplicativos citados no item anterior.

Para o cálculo do enriquecimento em ^{15}N nas amostras de plantas usou-se a simplificação da fórmula (1), porque o valor de I_{30} era desprezível. Baseado no equilíbrio isotópico:



cuja constante é aproximadamente igual a 4, na temperatura ambiente, obtém-se a fórmula simplificada:

$$\bar{\text{átomos}} \% ^{15}\text{N} = \frac{100}{I_{28} + 2 \frac{I_{29}}{I_{28}} + 1}$$

A demonstração desta fórmula simplificada encontra-se descrita em *TRIVELIN et al. (1973)*. Os valores de I_{28} e I_{29} usados foram subtraídos do "back-ground" do aparelho, no dia da análise.

A contaminação devido ao ar atmosférico foi corrigida, pelo oxigênio, quando esta contaminação não excedia a 3%, caso em que se descartava a análise.

O valor corrigido pode ser obtido pela seguinte relação:

$$\bar{\text{átomos}} \% ^{15}\text{N} = \frac{100}{2 \frac{I_{28}(a+c) - \frac{I_{29} \text{ ar}}{I_{32} \text{ ar}} \times I_{32} c}{I_{29}(a+c) - \frac{I_{29} \text{ ar}}{I_{32} \text{ ar}} \times I_{32} c} + 1}$$

sendo o índice "a", intensidade dos íons provenientes da amostra; o índice "c" intensidade dos íons provenientes do contaminante e o

Índice "ar", intensidades dos íons, da amostra de ar atmosférico.

4.1.2g. Cálculo do teor total de nitrogênio fixado

Conhecido o enriquecimento das amostras, a abundância natural das plantas estudadas e o nitrogênio total das amostras pode-se calcular o nitrogênio total fixado (*BERGERSEN, 1973*).

Subtraindo-se o enriquecimento das amostras da abundância natural obtêm-se átomos % ^{15}N em excesso, sendo a quantidade total de ^{15}N em excesso dada por:

$$^{15}\text{N total excesso} = \text{N total (KJELDAHL)} \times \frac{\text{átomos \% } ^{15}\text{N excesso}}{100}$$

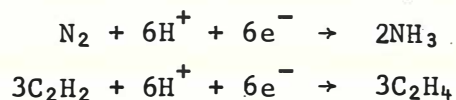
e a quantidade de N_2 fixado é dado por:

$$\text{N}_2 \text{ fixado} = ^{15}\text{N total excesso} \times \frac{100}{\text{átomo \% } ^{15}\text{N no gás da incubação}}$$

Em nosso trabalho o N total foi determinado pelo método se mi-micro de KJELDAHL conforme descrito em *MALAVOLTA (1974)*, utilizando um microdestilador.

4.1.3. Comparação entre os dois métodos

A comparação entre os dois métodos torna-se possível baseando se na atuação da nitrogenase sobre o N_2 ou C_2H_2 segundo as reações:



Sendo assim, pode-se medir a atividade da nitrogenase pela redução do acetileno em etileno, determinando-se a quantidade de etileno formada através da cromatografia gasosa. Para conversão dos resultados obtidos pela redução do C_2H_2 para N_2 fixado usa-se a relação teórica $3C_2H_2: 1N_2$, e conforme expressão de *HARDY & HOLSTEN (1972)*:

$$g N_2 (C_2H_2) \text{ fixado} = \text{moles de } \frac{C_2H_2 \rightarrow C_2H_4}{3} \times 28$$

Porém, cuidados especiais devem ser tomados ao se fazer esta transformação, porque os resultados na literatura nem sempre confirmam a relação teórica 3:1. Segundo *BURRIS (1974)*, o método de $^{15}N_2$ deve ser utilizado para se achar o fator de conversão de etileno no produzido para nitrogênio fixado.

4.2. Adaptação das plantas coletadas no campo

4.2.1. Coleta das plantas

Após definidas as espécies de plantas a serem utilizadas e os locais da coleta (ítem 3.1.), coletou-se os blocos de solo com planta, utilizando-se um cilindro de ferro de 16,5 cm de altura, 10 cm de diâmetro interno e 3 mm de espessura de parede. O cilindro era introduzido no solo com auxílio de um batente. Após alguns movimentos laterais com o cilindro conseguia-se retirar os blocos com solo e planta. Foram coletados 34 cilindros.

Manteve-se o sistema solo/planta dentro do cilindro de ferro em condições de casa de vegetação e fez-se a adubação referida no ítem 3.2.

A coleta e a adubação foram realizadas no dia 2 de janeiro de 1975 e o teste de acetileno para seleção dos melhores blocos (item 4.3.1.) foi realizado três dias após.

Toda esta etapa do serviço foi realizada no Rio de Janeiro (EMBRAPA, km. 47) e os 12 blocos mais ativos quanto a redução de acetileno foram acondicionados em caixas abertas de madeira e transportados para Piracicaba (CENA) para serem realizados os testes com $^{15}\text{N}_2$.

4.2.2. Adaptação das plantas em potes pequenos para incubação

O principal problema encontrado no início dos trabalhos foi o de adaptar o sistema solo/planta em blocos pequenos, em tamanho condizente com a câmara de incubação com $^{15}\text{N}_2$.

Após algumas outras tentativas concluiu-se que o melhor recipiente a disposição era o pote de plástico de 7 cm de altura e 4 cm de diâmetro. Fez-se vários orifícios na parede do pote para permitir boa circulação de gás.

A medida que se precisava de plantas para incubação fazia-se, alguns dias antes da incubação com $^{15}\text{N}_2$, o transplante das plantas e solo do cilindro de ferro para o pote pequeno de plástico. Como o sistema ficava perturbado, aguardava-se alguns dias para equilibrar (no item 4.3. será feita a referência do número de dias).

4.2.3. Iluminação e controle térmico da câmara de incubação de $^{15}\text{N}_2$

A iluminação da câmara foi efetuada por meio de oito lâmpadas fluorescentes de 20 watts (luz do dia) distribuídas em dois conjuntos laterais (Figura 5).

O controle térmico foi efetuado por meio de seis lâmpadas incandescentes de 100 w e do aparelho de ar condicionado do laboratório. Acendia-se o número de lâmpadas suficiente para se ter a temperatura desejada, combinando com uma das posições de controle térmico do aparelho de ar condicionado. Desta forma conseguia-se manter a temperatura durante o dia entre os 30 - 36°C e a noite (com todas as lâmpadas apagadas) entre 25 - 28°C.

4.3. Experimentos conduzidos

4.3.1. Seleção com C_2H_2 , das plantas coletadas no campo

Os blocos com solo/planta coletadas no campo (item 4.2.1.) foram colocados dentro de sacos de polietileno (item 3.3.1.).

Introduziu-se 350 ml de acetileno em cada saco, utilizando-se uma seringa de 50 ml.

O início da incubação foi às 11h 10m Às 13h 37m fez-se a primeira amostragem e às 15h 7m fez-se a segunda amostragem, que foram feitas com seringas de 1 ml, retirando-se apenas 0,5 ml para injetar-se no cromatógrafo, onde se fez a medida da concentração de etileno e acetileno.

O acetileno foi medido para se calcular o volume livre no interior de cada saco, que foi feito relacionando-se a leitura do padrão de acetileno injetado com a leitura do teor de acetileno da amostra, cuja diluição ocorrida é proporcional ao volume desejado. O volume médio encontrado foi de 3400 ml, sendo então, pressão parcial de acetileno de aproximadamente 0,10 atm, pois injetou-se 350 ml.

Levou-se em consideração, para seleção dos melhores blocos, a diferença entre o teor de etileno produzido até a segunda amostragem, subtraído do produzido até a primeira amostragem.

4.3.2. Determinação da abundância natural, em ^{15}N , das plantas

Fez-se uma amostragem das plantas de vários cilindros e separou-as em suas partes. A *Digitaria decumbens* foi separada em raiz, rizoma, caule e folha e o *Paspalum notatum* em raiz, rizoma e folha.

O material foi lavado, seco a 65°C , moído e analisado.

4.3.3. Teste em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas e destacadas

A planta utilizada foi *Paspalum notatum*. Colocou-se dentro da câmara (Figura 3) um pote pequeno de plástico com o sistema intacto (transplantado no dia anterior) e tomou-se várias outras plantas, separando-as em suas partes. Teve-se então os seguintes tratamentos para incubação:

Bloco intacto
Planta inteira sem solo
Rizoma + raiz (folha destacada)
Raiz destacada
Rizoma destacada
Folha destacada

As raízes e rizomas foram lavadas em água corrente e banhadas em solução de sacarose 0,5%.

A incubação teve início às 12,00 h do dia 14/01/75 e terminou às 18,00 h do dia seguinte (total de 30 horas). O período noturno foi das 23,00 h às 8,00 h (total noturno de 9 horas). A temperatura da câmara durante o dia variou entre 30 - 35°C e durante a noite entre 27 - 28°C. No início e no fim do experimento foi tirada a amostra de gás da câmara para análise. Ao término do experimento as plantas foram lavadas, secas a 65°C, pesadas, moídas e analisadas.

4.3.4. Teste, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas

A espécie utilizada foi *Digitaria decumbens* cv. transvala. As plantas foram transplantadas do cilindro para os potes pequenos de plástico, 3 dias antes do experimento. Foram colocados quatro potes dentro da câmara de vidro, capacidade máxima (Figura 3). Não foi adicionado sacarose no solo.

Como o experimento teve maior duração colocou-se um pouco d'água no fundo da câmara para evitar a secagem do solo.

O experimento teve início às 11,00 h do dia 17/02/75 e terminou às 16h 30m do dia 20/02/75 (total de 77h 30m). O período

noturno foi das 23,00 h às 8,00 h . A temperatura diurna da câmara variou de 30 a 36°C e a noturna de 25 a 27°C. Periodicamente era tirada amostra de gás da câmara para análise. Ao término do experimento as plantas receberam o mesmo tratamento do experimento anterior.

4.3.5. Teste, em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 , de plantas intactas

Foram utilizadas plantas de *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*. As plantas foram transplantadas dos cilindros para os potes pequenos 15 dias antes do início do experimento. Foram colocados sete potes pequenos dentro da câmara (Figura 4).

O esquema experimental foi o seguinte:

- D. decumbens* cv. transvala sem sacarose (a)
- D. decumbens* cv. transvala com sacarose (a)
- D. decumbens* cv. slenderstem com sacarose -
- P. notatum* cv. batatais sem sacarose (a)
- P. notatum* cv. batatais sem sacarose -
- P. notatum* cv. batatais com sacarose (a)
- P. notatum* cv. batatais com sacarose -

Foram colocados sete potes apenas porque esta é a capacidade máxima da câmara de lucite. Injetou-se, com seringa, no solo dos tratamentos correspondentes 4,25 ml de uma solução de sacarose 10% de tal forma que a diluição final foi de 0,5%.

O experimento com $^{15}\text{N}_2$ iniciou às 16,00 h do dia 17/03/75 e terminou 72 horas depois. O período noturno foi das 23 às 8h. Periodicamente era tirada amostras de gás da câmara para análise.

Encerrada a incubação com $^{15}\text{N}_2$ as plantas foram deixadas in

tactas até o dia seguinte para se iniciar o teste com C_2H_2 nos tratamentos assinalados (a), demais foram usados como testemunha, com incubação sem acetileno, para saber se haveria produção de etileno do solo. Para o teste de C_2H_2 os potes foram colocados dentro de vasos de Leonard invertido (Figura 2) e injetou-se 100 ml de acetileno ficando a pressão parcial de 0,11 atm.

O experimento iniciou-se às 9h 10m do dia 21/03/75 e fez-se a amostragem de gás, dos vasos de Leonard invertido para leitura cromatográfica do etileno produzido, às 13,00 horas. Os vasos ficaram no mesmo local da câmara para teste em $^{15}N_2$, portanto, receberam a mesma iluminação, porém, a temperatura ficou ligeiramente mais baixa, oscilou entre 29 e 33°C. Ao término do experimento as plantas receberam o mesmo tratamento do experimento anterior.

4.3.6. Teste em C_2H_2 , de plantas intactas após período de pré-incubação em temperatura baixa

A semelhança do item anterior, tomou-se sete potes para ser conduzido o experimento, sendo que não foi colocado tratamento com sacarose.

Todos os potes foram testados com acetileno antes da incubação com $^{15}N_2$ e posteriormente seria efetuado outro teste de acetileno.

Porém, como os valores de redução de acetileno no primeiro teste indicaram baixa atividade da nitrogenase, não foi dada continuação ao experimento e colheu-se as plantas.

A temperatura ambiente no período de cerca de 20 dias anterior a este teste estava em torno de 20 a 25°C durante o dia e 15 a 18°C durante a noite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção, com C_2H_2 , das plantas coletadas no campo. Experimento 4.3.1.

Os resultados dos testes dos blocos com o sistema solo/planta coletados no campo, acham-se no Quadro 12. Escolheu-se os doze cilindros com os sistemas mais ativos para serem testados com $^{15}N_2$, considerando-se que esta quantidade de planta seria suficiente para a realização dos testes com nitrogênio marcado.

Como as plantas, após esta primeira etapa dos testes, não poderiam ser colhidas dos cilindros, pois teriam que ser utilizadas posteriormente, ficou-se sem saber se as diferenças havidas entre

QUADRO 12 - Seleção, com C₂H₂, das plantas coletadas no campo (Experimento 4.3.1.).

Planta	Cilindro n ^o	nmoles C ₂ H ₄ / cilindro x hora
<i>Digitaria decumbens</i> cv. transvala	1	200
	2	400
	10	700
	11	1400*
	12	1800*
	14	700
	16	100
	18	400
	22	1400*
	25	1400*
	29	700
	31	500
	33	1326*
cv. slenderstem	3	400
	7	600
	9	400
	15	200
	26	400
	30	800
	34	2367*
<i>Paspalum notatum</i> cv. batatais	4	900
	5	1300*
	6	1500*
	8	600
	13	900
	14	1100*
	19	400
	20	800
	21	1300*
	23	0
	24	900
	27	1000*
	28	0
32	1000*	

* Cilindros transportados do Rio de Janeiro (km 47) para Piracicaba, SP. para serem realizados os testes com ¹⁵N₂.

os blocos eram devidas a sítios mais ativos ou a maior quantidade de raízes coletadas.

5.2. Determinação da abundância natural, em ^{15}N , das plantas. Experimento 4.3.2.

Os resultados das análises isotópicas das plantas para determinação da abundância natural em ^{15}N acham-se no Quadro 13. Houve pequena diferença entre as diversas partes das plantas, porém como o coeficiente de variação das análises variou entre 0,4 e 2,6% (item 5.7.), as diferenças encontradas foram desprezadas, e trabalhou-se com a média (0,367 átomos % ^{15}N).

Este valor está próximo dos valores encontrados por outros autores. *BERGERSEN (1973)* cita a variação na abundância natural encontrada entre 0,362 e 0,368. *RUSCHEL et al. (1975)* encontraram valores de 0,365 e 0,369.

Considera-se a possibilidade biológica de fracionamento isotópico no ciclo do nitrogênio, com a ocorrência de excesso de ^{15}N em vários aminoácidos naturais (*RANKANA, 1956*), as diferentes taxas de utilização dos isótopos de nitrogênio por diferentes microrganismos (*DELWICHE & STEYN, 1970*) e os valores de abundância isotópica diferentes para partes diversas da planta já encontrada por *RUSCHEL et al. (1975)*.

Baseando-se nestas referências acima, não se pode desprezar a possibilidade de haver diferenças na abundância isotópica nas partes das plantas estudadas, porém, considera-se que para estas diferenças serem detectadas, há necessidade de se trabalhar com um sistema analítico de maior precisão.

QUADRO 13 - Abundância natural, em ^{15}N , nas amostras de plantas utilizadas (Experimento 4.3.2.).

Planta	Parte da planta analisada	Átomo % ^{15}N
<i>Digitaria decumbens</i>	Raiz	0,368
	Rizoma	0,369
	Caule	0,366
	Folha	0,367
<i>Paspalum notatum</i>	Raiz	0,367
	Rizoma	0,365
	Folha	0,366
Média		0,367

5.3. Teste, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas e destacadas. Experimento 4.3.3.

Os valores da composição da atmosfera da câmara de incubação encontram-se no Quadro 14 e no gráfico 1, e os resultados das análises isotópicas de plantas de *Paspalum notatum* cv. batatais, encontram-se no Quadro 15.

Neste experimento inicial com $^{15}\text{N}_2$ procurou-se colocar plantas para incubação em várias condições, intacta ou destacada, para se ter uma idéia do comportamento das plantas dentro da câmara em ambiente artificial e da capacidade de incorporação de $^{15}\text{N}_2$.

Nas plantas destacadas lavou-se as raízes para remover o solo, uma vez que estava-se interessado no estudo da planta. Esta lavagem deu maior proteção a exposição das raízes à atmosfera livre, pela formação de uma película de água em torno das raízes e das colônias de bactérias. *ABRANTES et al. (1975b)* encontraram diferenças de 2,6 até 60 nmoles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$ raízes .h para raízes não lavadas e lavadas, respectivamente.

Banhou-se as raízes e rizomas com solução de sacarose 0,5% para se maximizar a fixação de $^{15}\text{N}_2$, porque se tratava de experimento inicial e os únicos resultados que se tinha para esta planta, como referência (*DOBEREINER & DAY, 1974a*), indicavam baixos valores de enriquecimento, com a agravante de terem trabalhado no limite do erro analítico.

Incubou-se as plantas nas pressões parciais de O_2 baixa e CO_2 alta para se assemelhar as condições dos microhabitats dos microrganismos conforme já foi comentado no item 2.4.

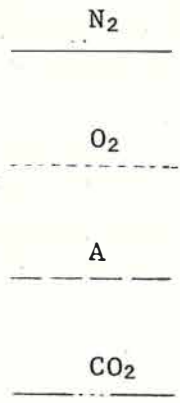
Os valores de fixação de N_2 no período de incubação de 30 ho

QUADRO 14 - Resultados das análises das amostras de atmosfera da câmara de incubação dos experimentos com $^{15}\text{N}_2$.

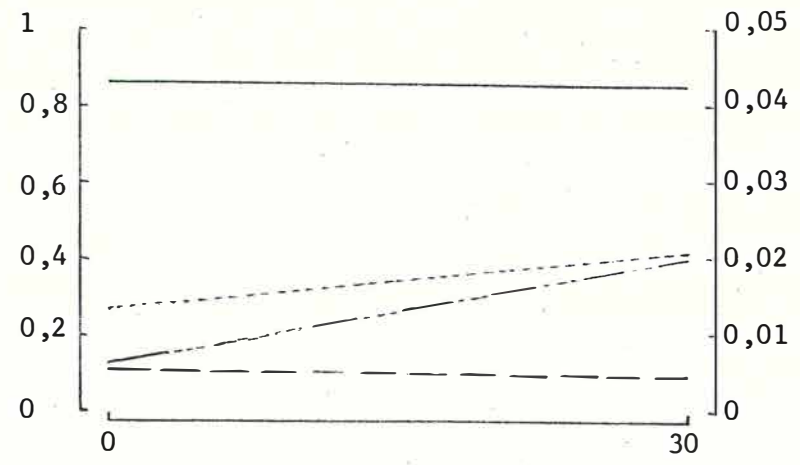
Experimento nº	Coleta (tempo) ^a	Pressão parcial (atm) ^b				Átomos % ^{15}N
		N ₂	O ₂	A	CO ₂	
4.3.3.	início	0,863	0,013	0,118	0,006	96,027
	fim	0,841	0,030	0,099	0,030	94,039
	média ^b	0,852	0,022	0,108	0,018	95,033
4.3.4.	início	0,852	0,017	0,111	0,020	94,040
	27,0	0,854	0,031	0,107	0,008	91,601
	30,0	0,855	0,037	0,107	0,001	92,250
	76,5	0,826	0,052	0,121	0,001	89,890
	média ^b	0,845	0,037	0,112	0,006	91,698
4.3.5.	0,3	0,414	0,026	0,553	0,007	87,420
	41,5	0,444	0,027	0,488	0,042	85,193
	70,3	0,411	0,025	0,522	0,042	83,540
	média ^b	0,428	0,026	0,514	0,032	85,488

^a Tempo após o início da incubação, em que foi realizada a coleta.
Os números representam horas.

^b Média ponderada.

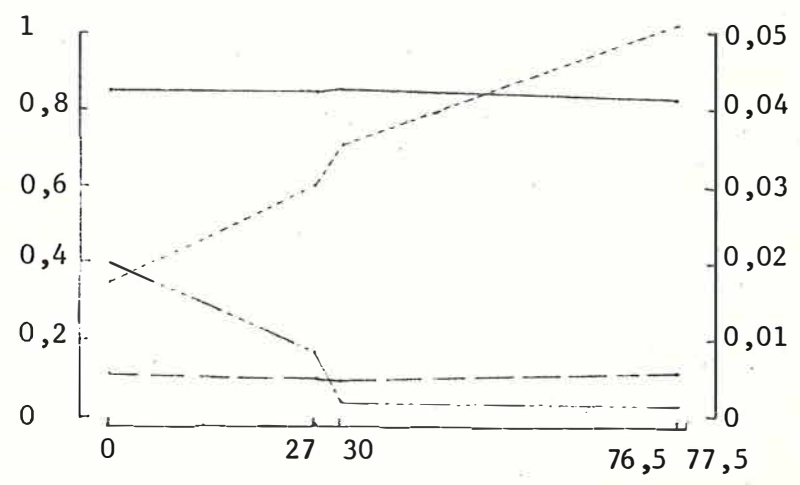


Experimento 4.3.3.



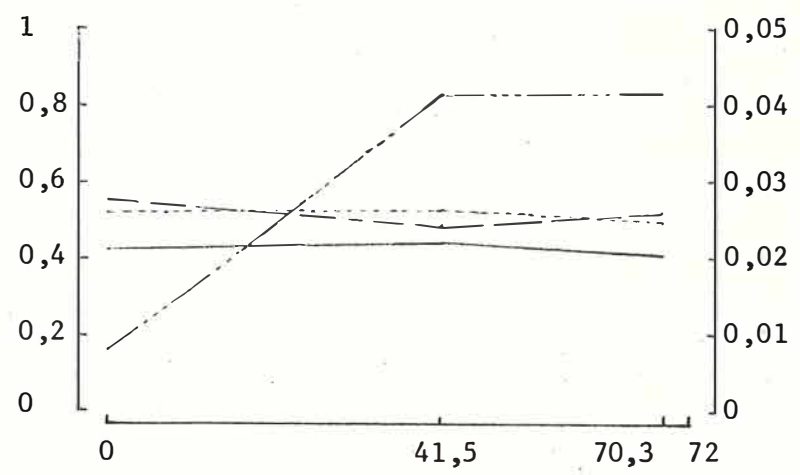
Experimento 4.3.4.

Pressão parcial (atm) de N₂ e A



Pressão parcial (atm) de O₂ e CO₂

Experimento 4.3.5.



Tempo (horas) de coleta após início do experimento

Gráfico 1 - Resultados das análises das amostras de atmosfera da câmara de incubação dos experimentos com ¹⁵N₂.

QUADRO 15 - Incubação, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas e destacadas de *Paspalum notatum* cv. batatais, durante 30 horas, sendo 11 h luz, 9 h escuro e 10 h luz. Pressão parcial dos gases (atm): $\text{pN}_2 = 0,852$; $\text{pO}_2 = 0,022$; $\text{pA} = 0,108$ e $\text{pCO}_2 = 0,018$. (Experimento 4.3.3.).

Condições das plantas para incubação	Partes das plantas analisadas	mg/pote		Átomos % ^{15}N excesso ^c	N ₂ fixado/30 horas incubação		N ₂ fixado ^d	
		Peso planta seca	N total		µg/pote	% relação total	µg/g (raiz + riz.)	nmols/g(ha x dia) ^e
com ^a solo	raiz	381	1,92	0,011	0,22	43,3	0,58	
	rizoma	445	2,03	0,007	0,15	29,2	0,34	
	folha	862	13,44	0,001	0,14	27,5	0,16	
	total	1688			0,51	100,0	0,30	1,06
sem ^b solo	raiz	955	4,17	0,022	0,97	61,3	1,01	
	rizoma	924	5,03	0,009	0,48	30,3	0,52	
	folha	946	12,59	0,001	0,13	8,4	0,14	
	total	2825			1,57	100,0	0,56	1,42
destacadas as folhas	raiz	724	3,45	0,123	4,47	71,0	6,17	
	rizoma	1155	4,95	0,035	1,82	29,0	1,58	
	total	1879			6,29	100,0	3,35	5,69
								26,8
destacadas as três partes	raiz	256	1,41	0,001	0,02	1,3	0,06	
	rizoma	1065	5,44	0,020	1,15	98,7	1,08	
	folha	632	7,56	0	0	0	0	
	total	1953			1,16	100,0	0,59	0,88
								7,0

^aFoi incubado apenas 1 pote com algumas plantas.

^bForam incubadas partes de várias plantas.

^cEnriquecimento de $^{15}\text{N} = 95,033\%$ no gás da câmara.

^dConsiderou-se ausência de fixação de N_2 durante o período escuro.

^eBasado em 11200 kg (raiz + rizoma) por ha.

ras variaram, para o total da planta, entre 0,30 e 3,35 μg de N_2/g planta. Os valores baixos de fixação encontrados podem ter sido devido a pouca umidade mantida na câmara de incubação, pois as plantas, ao final do experimento, estavam secas.

A incubação de rizoma com raiz (folha destacada) possibilitou a maior fixação, resultados já encontrados por outros autores (Quadro 4). Pode-se justificar em parte este efeito pela translocação de material de reserva do rizoma para a raiz. Neste caso, em que se forneceu material energético às raízes e aos rizomas com solução de sacarose, talvez, possa-se justificar aquele efeito também pela maior conservação da umidade nas raízes quando presas ao rizoma. Quer se comparando com as raízes destacadas, que evidentemente perde rapidamente a umidade; quer se comparando a planta inteira, quando, então, o maior superfície foliar aumenta as perdas de água.

A fixação foi sempre maior para as raízes do que para os rizomas ou as folhas, exceto para a incubação das raízes destacadas, que foram muito susceptíveis a secagem.

Procurou-se fazer uma estimativa da fixação de N_2 por dia por hectare. Embora muito sujeita a erros, esta estimativa é necessária para a extensão dos resultados. Para este cálculo baseou-se em 11200 kg de raiz + rizoma por hectare, valor este encontrado por *DÖBEREINER et al.* (1972b) para plantas coletadas na mesma região das utilizadas neste experimento. Este valor está próximo do relacionado por *TROUGHTON* (1957) para esta espécie.

Os valores em g/ha . dia obtidos para a fixação de nitrogênio não foram altas quando comparados aos dados de outros autores (Quadro 5). Variaram de 5,0 a 26,8 g/ha . dia.

5.4. Testes, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas intactas. Experimento 4.3.4.

A composição da atmosfera da câmara de incubação encontra-se no Quadro 14 e no Gráfico 1. Os resultados da incubação das plantas intactas de *Digitaria decumbens* cv. transvala encontram-se no Quadro 16.

O nitrogênio fixado expresso em $\mu\text{g}/\text{pote}$, $\mu\text{g}/\text{g}$ planta ou % em relação total encontrado nas diversas partes da planta foi decrescente no sentido raiz, rizoma, caule e folha, mostrando que, mesmo em período de 77,5 horas de incubação houve pouca translocação de ^{15}N das raízes e rizomas para a parte aérea da planta, indicando um lento metabolismo de aproveitamento, pelas folhas, do nitrogênio fixado nas raízes. Para as leguminosas este sistema é mais rápido, VICTORIA & SALATI (1975) encontraram o $^{15}\text{N}_2$ fixado por nódulos de *Phaseolus vulgaris* com os valores de $\delta^{15}\text{N}^0/00$ igual a 498,97 e 494,60 para a parte aérea e 477,37 e 362,67 para a raiz, em período de incubação de 24 horas.

Embora este presente experimento trata-se de gramínea, e a translocação para as folhas do N_2 fixado nas raízes ter sido lento, RUSCHEL *et al.* (1975) também trabalhando com gramíneas, embora da espécie da cana de açúcar, encontraram translocação à taxas comparáveis às leguminosas, discordando dos resultados encontrados neste experimento.

A semelhança do experimento anterior procurou-se estimar a fixação por hectare. Baseou-se em 6000 kg de raiz + rizoma por hectare, valor este encontrado por ABRANTES *et al.* (1975b) para esta planta coletada na mesma região. TROUGHTON (1957) relaciona valor próximo. Observa-se que *D. decumbens* possui, aproximadamente a metade da quantidade de raízes por hectare em relação a *Paspalum notatum*. Os valores de fixação obtidos variaram de 8,9 a 23,2 g/ha.dia, considerados baixos se comparado aos valores do Quadro 5.

QUADRO 16 - Incubação, em $^{15}\text{N}_2$, de plantas em blocos intactas de *Diglossa decumbens* cv. transvala durante 77,5 horas (ciclos de 15 h luz e 9 h escuro). Pressão parcial de gases (atm): $\text{pN}_2 = 0,845$; $\text{pO}_2 = 0,037$; $\text{pA} = 0,112$ e $\text{pCO}_2 = 0,006$. (Experimento 4.3.4.).

Pote nº	Parte da planta analisada	mg/pote		Átomos ^{15}N excesso ^a	N ₂ fixado/77,5 horas incubação		N ₂ fixado ^b	
		Peso planta seca	N total		µg/pote	% relação total	µg/g (raiz + riz.)	nmols/g (raiz + riz.) x h
1	raiz	512	2,41	0,117	3,08	45,1	6,01	3,49
	rizoma	869	5,02	0,047	2,57	37,7	2,96	
	caule	1225	7,17	0,011	0,86	12,6	0,70	
	folha	771	7,26	0,004	0,32	4,6	0,41	
	total	3377			6,82	100,0	2,02	
2	raiz	358	2,02	0,211	4,65	36,1	12,98	8,35
	rizoma	732	5,31	0,114	6,60	51,3	9,02	
	caule	623	2,64	0,033	0,95	7,4	1,53	
	folha	784	6,16	0,010	0,67	5,2	0,86	
	total	2497			12,87	100,0	22,39	
3	raiz	327	1,93	0,216	4,55	58,1	13,90	9,21
	rizoma	273	1,73	0,082	1,55	19,8	5,67	
	caule	1179	7,13	0,017	1,32	16,9	1,12	
	folha	960	9,29	0,004	0,41	5,2	0,42	
	total	2739			7,82	100,0	21,11	
4	raiz	332	1,79	0,139	2,71	59,6	8,17	4,68
	rizoma	356	2,44	0,049	1,30	28,6	3,66	
	caule	318	1,69	0,011	0,20	4,5	0,64	
	folha	426	3,83	0,008	0,33	7,3	0,78	
	total	1432			4,55	100,0	13,26	

^a Enriquecimento de $^{15}\text{N} = 91,698\%$ no gás da câmara.

^b Considerou-se ausência de fixação de N_2 durante período escuro.

^c Baseado em 6000 kg (raiz + rizoma) por ha.

5.5. Teste, em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 , de plantas intactas. Experimento 4.3.5.

A composição da atmosfera da câmara de incubação para $^{15}\text{N}_2$ encontra-se no Quadro 14 e no Gráfico 1. Os resultados da incubação das plantas intactas de *Digitaria decumbens* cv. transvala e cv. slenderstem e *Paspalum notatum* cv. batatais em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 encontram-se no Quadro 17 e Gráfico 2.

A comparação dos valores de nitrogênio fixado em *D. decumbens* neste experimento e no anterior estão dentro da mesma faixa e a incubação neste experimento foi realizado numa atmosfera com as pressões parciais (atm) de $p\text{N}_2 = 0,428$; $p\text{O}_2 = 0,026$; $p\text{CO}_2 = 0,032$, enquanto no experimento anterior teve-se $p\text{N}_2 = 0,845$; $p\text{O}_2 = 0,037$ e $p\text{CO}_2 = 0,006$ (Quadro 14). Isto pode indicar que as alterações nos valores das pressões parciais destes gases, dentro desta faixa, não altera o comportamento das plantas. Sobre os valores de $p\text{N}_2$ a serem utilizados BERGERSEN (1973) já cita que $p\text{N}_2 = 0,2$ atm, 3 vezes o Km (N_2), pode ser utilizado. Quanto as variações na relação CO_2/O_2 , suas implicações à fotossíntese e à fixação de N_2 são válidos aqui os comentários efetuados no ítem 2.5.3.

O nitrogênio fixado encontrado na parte aérea em relação ao encontrado na raiz ou rizoma foi sempre maior, valendo os mesmos comentários feitos no ítem anterior. Embora neste caso, observando-se os valores em $\mu\text{g}/\text{pote}$, $\mu\text{g}/\text{g}$ planta ou a % em relação ao total, em muitos casos o rizoma teve valores maiores que a raiz, mostrando que a fixação de N_2 realizada no rizoma é quantitativamente importante, embora parte do N_2 fixado possa ter sido translocado da raiz. No Quadro 4, DÖBEREINER et al. (1973) encontraram atividade da nitrogenase no rizoma cerca de três vezes menor que na raiz, justificando a hipótese de ter havido translocação no caso anterior.

Os tratamentos que tiveram adição de sacarose mostraram-se

QUADRO 17 - Incubação, em $^{15}\text{N}_2$ e em C_2H_2 , de plantas em blocos intactos de *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum* durante 72 horas (ciclos de 15 h luz e 9 h escuro). Pressão parcial dos gases (atm): $\text{pN}_2 = 0,026$; $\text{pO}_2 = 0,428$; $\text{pH}_2 = 0,514$ e $\text{pCO}_2 = 0,032$. (Experimento 4.3.5.0).

Planta	Pote nº	Saca rose	Parte da planta analisada	Peso planta seca	mg/pote	N total	Z ^{15}N excessão	N ₂ fixado/72 horas incubação		N ₂ fixado ^b	mmoles C ₂ H ₂ /g (raiz + riz.) x h ^d	Relação molar N ₂ : C ₂ H ₂	
								µg/pote	% relação total				µg/g planta (raiz+riz.)
<i>Digitaria decumbens</i> cv. transvala	1	sem	raiz	340	1,78	0,151	2,69	33,1	7,91				
			rizoma	416	2,74	0,146	4,00	49,3	9,62				
			caule	1107	4,32	0,021	0,91	11,2	0,82				
			folha	911	7,34	0,007	0,51	6,3	0,56				
			total	2774		8,11	100,0	2,92	10,73	21,5	8,52	185,0	1:21,7
cv. slenderstem	3	com	raiz	369	1,79	0,276	4,94	32,0	13,39				
			rizoma	862	5,68	0,154	8,75	56,7	10,15				
			caule	914	4,06	0,012	0,49	3,2	0,53				
			folha	1051	7,77	0,016	1,24	8,1	1,18				
			total	3196		15,42	100,0	4,82	12,52	25,0	9,94	149,3	1:15,0
<i>Paspalum notatum</i> cv. batatais	4	sem	raiz	771	3,73	0,567	21,15	62,5	27,43				
			rizoma	868	3,39	0,287	9,73	28,7	11,21				
			folha	1065	9,31	0,032	2,98	8,8	2,80				
			total	2704		33,86	100,0	12,52	20,66	77,1	16,39	46,4	1:2,8
			5	sem	raiz	547	2,06	0,560	11,54	32,6	21,09		
rizoma	626	1,86			1,120	20,83	59,0	33,28					
folha	320	2,75			0,108	2,97	8,4	9,28					
total	1493				35,34	100,0	23,67	30,13	112,5	23,91	-	-	
6	com	raiz			442	2,49	1,068	26,59	30,9	60,17			
		rizoma	793	3,09	1,924	59,45	69,1	74,97					
		folha	384	2,79	0,033	0,92	1,1	2,40					
		total	1619		86,05	100,0	53,15	69,67	360,1	55,30	253,8	1:4,6	
		7	com	raiz	728	2,93	0,974	28,54	46,7	39,20			
rizoma	817			3,41	0,860	29,33	48,0	35,90					
folha	619			4,37	0,073	3,19	5,2	5,15					
total	2164				61,05	100,0	28,21	39,52	147,5	31,36	-	-	

^a Enriquecimento de $^{15}\text{N} = 85,488\%$ no gás da câmara.

^b Considerou-se ausência de fixação de N_2 durante período escuro.

^c Baseado em 6000 e 11200 kg (raiz + rizoma) por ha, respectivamente para *D. decumbens* e *P. notatum*.

^d Incubou-se, no dia seguinte, por 3h 50m com 11% de C_2H_2 .

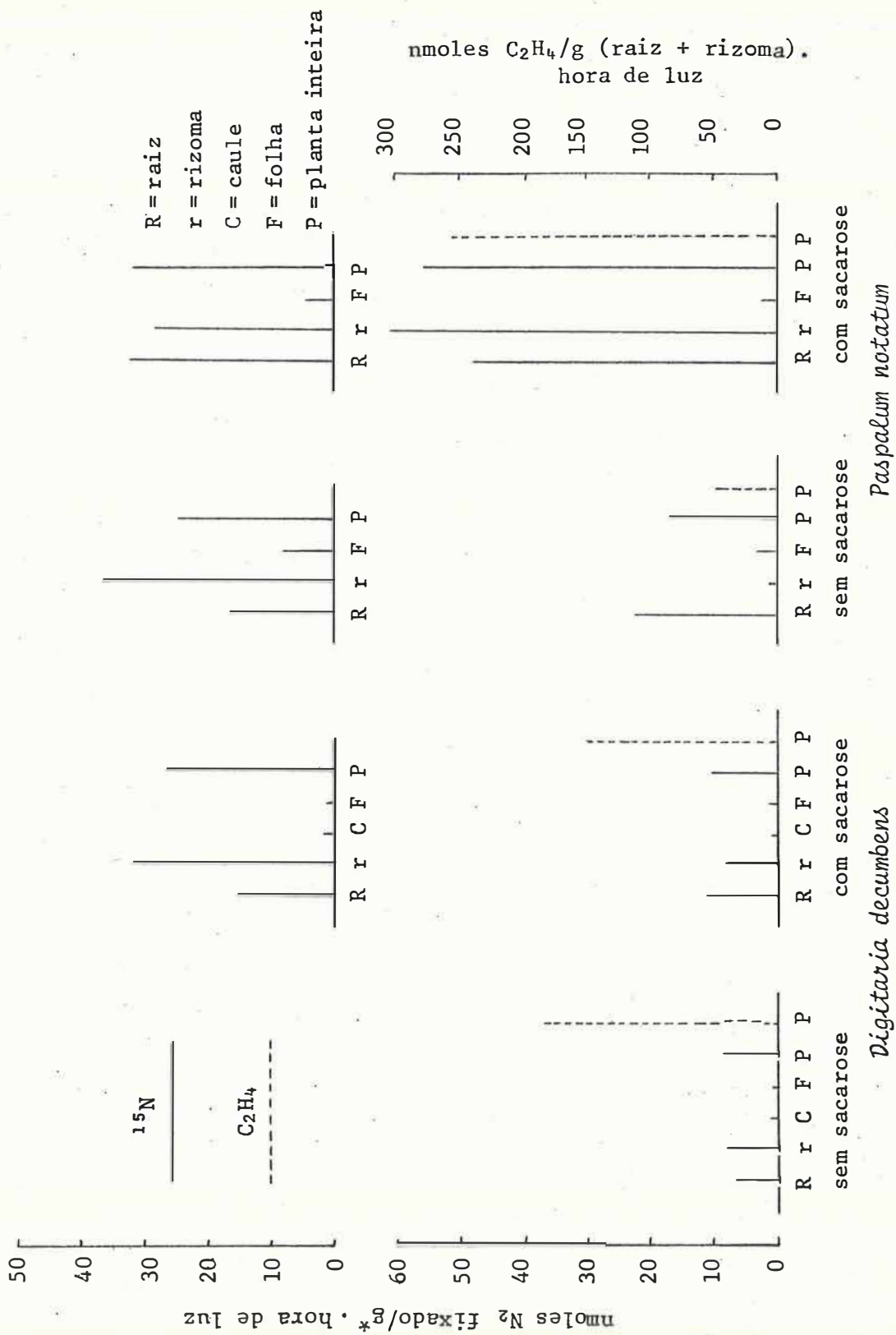


Gráfico 2 - Incubação de plantas em blocos intactos durante 72 horas (Experimento 4.3.5.).

* Para P, nmoles N_2/g (raiz + rizoma), demais g de raiz, rizoma, caule e folha.

estimuladores da fixação de N_2 e da atividade da nitrogenase principalmente para *P. notatum*. Houve menor aumento para *D. decumbens* cv. transvala, inclusive tendo diminuído o valor de C_2H_4 evoluído, isto é, justificado pelo trabalho de DOBEREINER & DAY (1974a) onde foi necessário substituição de sacarose por malato para isolamento de *Spirillum lipoferum* bactéria responsável pela fixação de N_2 nesta planta.

Tentou-se fazer uma comparação entre os valores obtidos aplicando-se os métodos de incorporação de $^{15}N_2$ e de redução de C_2H_2 . Embora a técnica de incubação utilizada nos dois sistemas esteja bastante imperfeita, fizemos a comparação apenas para se ter uma referência da relação $N_2:C_2H_2$ para estas plantas.

O efeito da variação diária (Ítem 2.3.3.) que ocorre principalmente pela variação da intensidade luminosa quando em condições naturais, provavelmente tenha tido pouca variação nas incubações deste experimento por ter sido feita iluminação artificial que tem intensidade luminosa uniforme durante o dia, possibilitando a comparação da incubação por um período longo com $^{15}N_2$ ser comparada com a incubação por um período curto com C_2H_2 . A incubação em atmosfera com composições diferentes utilizadas nos dois sistemas evidentemente pode ter distorcido os resultados, pois para a incubação com $^{15}N_2$ utilizou-se a relação CO_2/O_2 (Quadro 14 e Gráfico 1) muito superior a utilizada na incubação com C_2H_2 , que foi a relação CO_2/O_2 natural. Este efeito sobre as bactérias pode ter sido minimizado por ter-se deixado o sistema estabilizar de um dia para o outro, onde nos microhabitats do solo, a relação CO_2/O_2 pode ter tendido a se aproximar devido a produção de CO_2 e consumo de O_2 .

Ambos os sistemas de incubação receberam o sistema solo/planta. A análise isotópica foi efetuada na planta, não tendo sido incluída a fixação ocorrido no solo. No método de C_2H_2 aplicado, ficou incluído a evolução de C_2H_4 proveniente de microrganismos do so

lo, exceto os fixadores fotossintéticos, pois o pote foi devidamente protegido da radiação luminosa. Os resultados do Quadro 4 e 5 obtidos para este mesmo sistema solo/planta mostram valores muito baixo de nmoles de C_2H_4/g solo . h. Estas considerações levam a se admitir pouca interferência da não inclusão da possível fixação de $^{15}N_2$ ocorrido no solo, exceto, no tratamento com sacarose para a planta *P. notatum* onde o valor de C_2H_4 está evidentemente superestimado.

Os resultados obtidos para a relação $C_2H_2:N_2$ para *D. decumbens* cv. transvala foram de 21,7 e 15,0, respectivamente para os tratamentos sem e com sacarose. Para *P. notatum* cv. batatais foram de 2,8 e 4,6, respectivamente para os tratamentos sem e com sacarose, mostrando para a primeira planta relações longe do valor 3 (item 4.1.3.) da relação teórica, enquanto para a segunda planta há uma proximidade muito grande entre os valores obtidos e o valor teórico. Algumas relações obtidas por outros autores demonstraram a variabilidade entre os valores obtidos e o valor teórico. BROUZES *et al.* (1971) encontrou os valores 12 e 10, para população de *Azotobacter* e 22 para *Clostridium*. MacRAE (1975) trabalhando com nódulos de *Phaseolus vulgaris* obteve 4,75 e cita HARDY *et al.* (1973) que obteve 1,5 e 8,4. Sendo assim, entre outras razões, a solubilidade relativamente maior do C_2H_2 em água e lipídeos, comparada com o N_2 , pode dar maior difusibilidade do C_2H_2 para os sítios ativos da nitrogenase e o fator 3:1 poderá não ser obtido (POSTGATE, 1971).

A semelhança do que foi realizado e comentado nos dois experimentos anteriores fez-se a extensão dos resultados obtidos com $^{15}N_2$ para g de N_2 fixado por ha por dia. Considerou-se além desta transformação, arbitrariamente é claro, que em 300 dias do ano as plantas realizem a fixação na mesma taxa do período de incubação com $^{15}N_2$, eliminando-se os dois meses mais frio do ano onde a atividade é baixa (ABRANTES *et al.*, 1975a), obtendo assim fixação de N_2 em kg/ha . ano.

A espécie *D. decumbens* cv. transvala teve fixação de 21,5 e 25,0 e o cv. slenderstem teve 67,3 g de N_2 /ha . dia que multiplicado por 300 tem-se 6,5; 7,5 e 20,2 kg de N_2 fixado/ha . ano, podendo-se dizer que para o segundo cultivar há suprimento nitrogenado para a planta que pode substituir parcialmente uma adubação nitrogenada.

A espécie *P. notatum* cv. batatais teve fixação de 77,1 e 112,5 g N_2 /ha . dia (tratamento sem sacarose) e 360,1 e 147,5 g N_2 /ha . dia (tratamento com sacarose). Multiplicando-se por 300 tem-se 23,1 e 33,8 kg N_2 fixado/ha . ano (sem sacarose) e 108,0 e 44,3 kg N_2 fixado/ha . ano (com sacarose). Valores estes que exemplificam a possibilidade de substituição total da adubação nitrogenada para uma gramínea que possui uma desenvolvida associação com bactérias fixadoras de N_2 , mostrando a grande importância para a agricultura tropical desta característica biológica, justificando que seja feito investimento financeiro na pesquisa científica destes sistemas fixadores de N_2 .

5.6. Teste, em C_2H_2 , de plantas intactas após período de pré-incubação em temperatura baixa. Experimento 4.3.6.

Os resultados deste experimento encontram-se no Quadro 18. Conforme já foi comentado no ítem 4.3.6., objetivava-se com este experimento repetir o experimento 4.3.5. para se ter maior certeza nos resultados, além de se ter dados de C_2H_4 antes e depois da incubação com $^{15}N_2$. A temperatura ambiente no período de cerca de 20 dias anterior a este teste foi em torno de 20 - 25°C durante o dia e 15 - 18°C durante a noite. Isto diminuiu sensivelmente a ativada de da nitrogenase, mesmo mantendo-se a temperatura, durante a incubação com C_2H_2 , em torno de 30°C. Sendo assim, não foi dada continuidade ao experimento, pois a temperatura ambiente posteriormente tendeu a abaixar mais, com a chegada do inverno. *ABRANTES et al. (1975a)*

QUADRO 18 - Incubação de plantas, em atmosfera contendo 11% de C_2H_2 , a temperatura de 29 - 30°C após período de temperaturas de 15 - 25°C. (Experimento 4.3.6.).

P l a n t a	P o t e nº	nmoles C_2H_4/g (raiz + riz.) x hora
<i>Digitaria decumbens</i> cv. transvala	1	9,15
	2	6,90
	3	5,75
cv. slenderstem	4	6,70
<i>Paspalum notatum</i> cv. batatais	5	6,11
	6	4,65
	7	7,73

em experimento estacional também encontrou atividade baixa no período de inverno.

5.7. Coeficiente de variação das análises

Calculou-se os coeficientes de variação (CV) conforme *BRITTO (1968)* e *GOMES (1971)*, considerando-os como medida de precisão analítica.

As análises cromatográficas de etileno de amostras coletadas, com 4 repetições, de um mesmo frasco de incubação e analisadas consecutivamente em um mesmo dia, tiveram o coeficiente de variação entre 4,1 e 4,6%. Provavelmente, se tivesse sido utilizado seringa de injeção de amostra mais precisa poderia ser obtido valores de CV mais baixo.

As análises de nitrogênio pelo método de *KJELDAHL*, tomando-se como base amostras de plantas analisadas com 5 repetições, em dias diversos, com os mesmos reagentes, tiveram o coeficiente de variação de 1,4% e análises, com 7 repetições, de solução padrão contendo nitrogênio teve o CV de 2,3%. Parece que a pesagem das plantas propiciou maior precisão do que a pipetagem da solução padrão.

Para as análises isotópicas de nitrogênio, inicialmente procurou-se determinar o melhor número de repetições de varredura de uma mesma amostra de gás injetada no aparelho, ou seja, quantos picos de massa 28 e 29 seriam repetidos no registrador. Concluiu que se poderia trabalhar com 8 repetições. Os coeficientes de variação, neste caso, variaram de 0,22 a 0,77%. Para 5 a 6 amostras de uma mesma planta analisadas em dias diversos, obteve-se CV de 2,62% e analisadas em um mesmo dia obteve-se CV de 0,40%.

É claro que mesmo analisando-se diversas amostras de uma

mesma planta em um mesmo dia poderia-se obter CV maior que 0,40%. Haja visto que no exemplo acima teve-se valor de CV de até 0,77%, variando-se apenas a varredura. Vários fatores contribuem para o erro analítico: heterogeneidade da amostra, instabilidade do aparelho, cotação dos espectrogramas, etc.

Consideramos satisfatória a variação de 0,40 a 2,62 %no CV das análises das amostras de plantas obtidas. Consideramos confiáveis os resultados obtidos para enriquecimento em ^{15}N nas plantas, exceto para os valores de % ^{15}N em excesso abaixo de 0,010, quando considerado o maior valor de CV. Nos Quadros 15, 16 e 17 fez-se os cálculos para o teor de N_2 fixado mesmo para % ^{15}N em excesso menor que 0,010, embora, nestes casos, haja pouca confiabilidade nos dados.

6. CONCLUSÕES

1. A metodologia utilizada para incubação em C_2H_2 e em $^{15}N_2$ pode-se dizer que atendeu satisfatoriamente as necessidades experimentais, podendo ser empregada em experimentos futuros.

2. A técnica empregada para comparação dos métodos de C_2H_2 e de $^{15}N_2$ devem sofrer uma evolução no sentido de uniformizar as condições nas duas situações, para se obter resultados mais exatos.

3. A utilização de tempo longo de incubação em $^{15}N_2$ (cerca de três dias) apresentou a vantagem de se obter maior enriquecimento nas amostras de plantas, possibilitando maior certeza analítica.

4. Não houve diferença no enriquecimento em $^{15}N_2$ de plantas

de *Digitaria decumbens* quando incubadas com pressões parciais (em atm) de $pN_2 = 0,845$; $pO_2 = 0,037$ e $pCO_2 = 0,006$ comparando-se com incubação a $pN_2 = 0,428$; $pO_2 = 0,026$ e $pCO_2 = 0,032$. Sugerimos, no entanto, pesquisa mais detalhada sobre o aspecto de fisiologia de planta e microbiologia do solo, principalmente sobre a alteração na relação CO_2/O_2 e seu efeito sobre plantas C 4.

5. Foi encontrado incorporação de $^{15}N_2$ em raízes e rizomas destacados, lavados previamente, mostrando que o sítio da fixação de N_2 é diretamente associado às raízes. Não se pôde pesquisar, no entanto, o grau de intimidade nesta associação de bactérias e raízes de gramíneas.

6. O enriquecimento em ^{15}N encontrado no caule e na folha, incubando-se a planta intacta, foi sempre muito mais baixo do que o encontrado na raiz e rizoma. Indicando que é lenta a translocação do N_2 fixado na raiz e rizoma para a parte aérea da planta.

7. As relações molares obtidas entre a redução de C_2H_2 e a incorporação de N_2 , embora não tenham sido muito exatas quanto ao valor absoluto, indicam que houve diferença muito grande entre as duas espécies estudadas. Mostrando a necessidade de obter, para cada espécie (ou cultivar), o fator de transformação para se extrapolar os dados obtidos da redução de C_2H_2 para N_2 fixado.

8. Os valores de fixação de $^{15}N_2$ encontrados para *Digitaria decumbens* foram menores que para *Paspalum notatum*, mas permitem concluir que há possibilidades, mesmo com o estágio de conhecimento atual, de substituição parcial ou total da adubação nitrogenada para uma gramínea forrageira tropical, que possui uma desenvolvida associação com bactérias fixadoras de N_2 . Mostrando, então, a grande importância para a agricultura tropical desta característica biológica, justificando que seje efetuado investimento financeiro na pesquisa científica destes sistemas fixadores de nitrogênio atmosférico.

7. RESUMO

Foram coletadas gramíneas forrageiras tropicais em campo onde estavam estabelecidas há alguns anos. Utilizou-se da espécie *Digitaria decumbens* cv. transvala e cv. slenderstem e da espécie *Paspalum notatum* cv. batatais, que possuem a via fotossintética de *HATCH & SLACK* (via C4).

Estas plantas coletadas em blocos com o sistema solo/planta, foram selecionadas através do método de redução de acetileno (C_2H_2) e submetidas a testes de incorporação de nitrogênio molecular marcado ($^{15}N_2$) em câmara com atmosfera artificial.

Os resultados obtidos para a relação molar de $C_2H_2 : N_2$ para

D. decumbens cv. transvala foram de 21,7 e 15,0 e para *P. notatum* cv. batatais foram de 2,8 e 4,6, respectivamente sem e com sacarose. Enquanto para a primeira planta as relações obtidas estão longe da relação teórica $3 \text{ C}_2\text{H}_2 : 1 \text{ N}_2$, a segunda planta apresentou as relações obtidas próximas da relação teórica.

Os valores encontrados em um dos experimentos com 72 horas de incubação expressos em μg de N_2 total fixado/g de raiz + rizoma seco foram para o cv. transvala 10,7 e 12,5; para o cv. slenderstem 33,6 e para o cv. batatais 20,7; 30,1; 69,7 e 39,5. Expressos em gN_2 fixado/ha .dia obteve-se para o cv. transvala 21,5 e 25,0; para o cv. slenderstem 67,3 e para o cv. batatais 77,1; 112,5; 360,1 e 147,5. Os valores sem e com grifo são respectivamente dos tratamentos sem e com sacarose.

Os resultados permitiram concluir que há possibilidades, com os conhecimentos atuais, de substituição parcial ou total da adubação nitrogenada para gramíneas forrageiras tropicais que possuam eficientes bactérias fixadoras de N_2 associadas às suas raízes.

8. SUMMARY

$^{15}\text{N}_2$ - FIXATION OCCURENCE IN TROPICAL GRASSES (*Digitaria decumbens* AND *Paspalum notatum*)

Tropical pasture grasses growing for many years in field were collected. *Digitaria decumbens* cv. transvala and cv. slenderstem and *Paspalum notatum* cv. batatais have the HATCH & SLACK photosynthetic CO_2 -fixation pathways (C 4).

These plants were collected in sample with the soil/plant sistem and selected by the C_2H_2 reduction method and submitted to $^{15}\text{N}_2$ test in chamber with artificial atmosphere.

Determination of molar ratio ($\text{C}_2\text{H}_2 : \text{N}_2$) by *D. decumbens* cv.

transvala gave values of 21.7 and 15.0, by *P. notatum* cv. batatais of 2.8 and 4.6 respectively without and with saccharose. The molar ratios of the first grass was not the same as the theoretical ratio $3 \text{ C}_2\text{H}_2 : 1 \text{ N}_2$ but the second grass presented an approximated conversion factor.

In an experiment plants were incubated for 72 hours. The results in $\mu\text{g N}_2$ fixed/g (dry roots plus rhizomes) showed values by cv. transvala of 10.7 and 12.5, by cv. slenderstem of 33.6, by cv. batatais of 20.7, 30.1, 69.7 and 39.5. N_2 -fixation estimated in g N_2 fixed/ha x day showed by cv. transvala of 21.5 and 25.0, by cv. slenderstem of 67.3, by cv. batatais 77.1, 112.5, 360.1 and 147.5. The simples numbers are treatment without saccharose and the numbers underlined are treatment with saccharose.

Nowadays the results allowed us to conclude the possibility of substituting partialy or totally mineral nitrogen fertilization by tropical pasture grasses if the plants have effective N_2 -fixation bacteria root association.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-MALEK, Y. 1971. Free-living nitrogen-fixing bacteria in Egyptian soils and their possible contribution to soil fertility. *Plant & Soil, Special Volume*: 423-442.

ABRANTES, G.T.V.; J.M. DAY; V.F. CRUZ & J. DÖBEREINER. 1975a. Fatores limitantes da fixação de nitrogênio em campo de *Digitaria decumbens* cv. transvala. Campinas, XV Congr. Brasil. Ciência do Solo.

ABRANTES, G.T.V.; J.M. DAY & J. DÖBEREINER. 1975b. Métodos para estudo da atividade da nitrogenase em raízes de gramíneas colhidas no campo. Campinas, XV Congr. Brasil. Ciência do Solo.

- ALEXANDER, M. 1961. Introduction to soil microbiology. New York & London, John Wiley & Sons Inc., 472p.
- BALANDREAU, J.; G. RINAUDO; F. HAMAD & Y. DOMMERGUES. 1973. N₂ fixation in paddy soils. In: Stewart, W.D.P., ed. Nitrogen fixation in the biosphere. Cambridge Univ. Press. Vol. 1 (no prelo).
- BALANDREAU, J. & G. VILLEMIN. 1973. Biological fixation of molecular nitrogen under savanna conditions in Lamto (Lower Ivory Coast). Preliminary results. Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol, 10: 25-33 (1973). In: Soils & Fertilizers, 36:378.
- BEIJERINCK, M.W. 1901. Zentr. Bakteriolog. Parasit. Abt. II 7:561-582. Citado por Mulder & Brotonegoro (1974).
- BEIJERINCK, M.W. 1925. Zentr. Bakteriolog. Parasit. Abt. II 63:353-359. Citado por Döbereiner & Day (1974a).
- BENEMANN, J.R.; D.C. YOCH; R.C. VALENTINE & D.I. ARNON. 1971. Biochim. Biophys. Acta, 226:205-212. Citado por Mulder & Brotonegoro(1974).
- BERGERSEN, F.J. 1973. The use of ¹⁵N in N₂-fixation experiments. Campinas, Curso Avançado Transf. Microb. Nitrogênio, Regional GIAM-IV, 39p. (mimeo.).
- BERGERSEN, F.J. & E.H. HIPSLEY. 1970. The presence of N₂-fixing bacteria in the intestines of man and animals. J. Gen. Microbiol., 60:61-65.
- BIDWELL, R.G.S. 1974. Plant physiology. New York, MacMillan Publ., 643p.

BRITTO, D.P.P. de S. 1968. Estatística aplicada às ciências biológicas e à experimentação. Rio de Janeiro, UFRRJ. (mimeo.).

BROUZES, R.; C.I. MAYFIELD & R. KNOWLES. 1971. Effect of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a Sandy Loam soil amended with glucose. *Plant & Soil, Special Volume*:481-494.

BÜLOW, J.F.W. von & J. DÖBEREINER. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72:2389-2393.

BURRIS, R.H. 1971. Fixation by free-living microorganisms enzymology. In: Postgate, J.R., ed. *The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation*. London & New York, Plenum Press, p.105-160.

BURRIS, R.H. 1974. Methodology. In: Quispel, A., ed. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., p.9-33.

CAMARGO, M.N. 1966. Normas para exames e descrição de perfis e seu registro. Div. Ped. Fert. Solos, Min. Agric., Rio de Janeiro. (mimeo.).

CAMARGO, O.A. de. 1971. Contribuição ao estudo do ar do solo. Piracicaba, ESALQ-USP, Tese de Mestrado, 61p.

CAMARGO, O.A. de; F. GROHMANN; E. SALATI & E. MATSUI. 1974. A technique for sampling the soil atmosphere. *Soil Sci.*, 117: 173-174.

- CAMPÊLO, A.B. & J. DÜBEREINER. 1970. Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns Estados brasileiros. *Pesq. Agropec. bras.*, 5: 327-332.
- CONN, E.E. & P.K. STUMPF. 1972. Manual de bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, ed. da USP, 428p.
- CROCOMO, O.J. 1974. Recentes progressos em bioquímica de plantas. *Ciência e Cultura*, 26:128-137.
- DAJOZ, R. 1973. Ecologia geral. Petrópolis, Vozes, ed. da USP, 2^a edição, 474p.
- DALTON, H. & J.R. POSTGATE. 1969. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *J. gen. Microbiol.*, 54:463-473.
- DART, P.J.; D. HARRIS & J.M. DAY. 1972a. Nitrogen fixation associated with the roots of tropical grasses. Rothamsted Report, Part 1, 87.
- DART, P.J.; J.M. DAY & D. HARRIS. 1972b. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. Vienna, Tech. Rep. Intern. Atomic Energy Agency, 149:85-100.
- DELWICHE, C.C. 1974. O ciclo do nitrogênio. In: A biosfera, textos do Scientific American. São Paulo, Polígono, ed. da USP, p.77:89.
- DELWICHE, C.C. & P.L. STEYN. 1970. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environmental Science & Technology*, 4:929-935.

- DILWORTH, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta, 127:285-294.
- DILWORTH, M.J. 1970. The acetylene reduction method for measuring biological nitrogen fixation. Rhizob. Newsletter, 15:7-15.
- DROZD, J. & J.R. POSTGATE. 1970. Interference by oxygen in the acetylene reduction test for nitrogen fixing bacteria. J. gen. Microbiol., 60:427-429.
- DÖBEREINER, J. 1953. *Azotobacter* em solos ácidos. Rio de Janeiro, Inst. Ecol. Exper. Agric., Bol. n^o 11.
- DÖBEREINER, J. 1959. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. Rev. Brasil. Biol., 19:151-160.
- DÖBEREINER, J. 1961. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. Plant & Soil, 15:211-217.
- DÖBEREINER, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Pesq. agropec. bras., 1:357-365.
- DÖBEREINER, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. Zentr. Bakteriolog. Parasit., II 124:224-230. Citado por Döbereiner & Day (1974b).

- DOBBEREINER, J. 1973. Fixação de N_2 na rizosfera de gramíneas tropicais. Campinas, Curso Avançado Transf. Microb. Nitrogênio, Regional GIAM-IV, 29p. (mimeo.).
- DÖBEREINER, J. & R. ALVAHYDO. 1966. Eliminação da toxidez de manganes pela matéria orgânica em solo Gray Hidromórfico. *Pesq. Agropec. bras.*, 1:243-248.
- DÖBEREINER, J. & A.B. CAMPÊLO. 1971. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. *Plant & Soil, Special Volume*: 457-470.
- DÖBEREINER, J. & J.M. DAY. 1974a. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Washington, Intern. Symposium Nitrogen Fixation.
- DÖBEREINER, J. & J.M. DAY. 1974b. Associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com raízes de gramíneas. Porto Alegre, Reunião Latino-amer. do Trigo.
- DÖBEREINER, J. & J.M. DAY. 1975. Dinitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: Stewart, W.D.P., ed. Nitrogen fixation in the biosphere. Cambridge Univ. Press., 1: 39-52.
- DÖBEREINER, J.; J.M. DAY & J.F.W. von BULOW. 1975. Associations of nitrogen fixing bacteria with roots of forage grass and grain species. Yugoslavia, Intern. Winter Wheat Confer.
- DÖBEREINER, J.; J.M. DAY & P.J. DART. 1972a. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. *Plant & Soil*, 37:191-196.

- DÖBEREINER, J.; J.M. DAY & P.J. DART. 1972b. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali* association. J. gen. Microbiol., 71:103-116.
- DÖBEREINER, J.; J.M. DAY & P.J. DART. 1973. Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum* e da cana de açúcar. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 8:153-157.
- DÖBEREINER, J. & A.P. RUSCHEL. 1958. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. Rev. Biol. Lisboa, 1:261-272.
- DUCATI, C.; H. DE-POLLI & P.C.O. TRIVELIN. 1974. Espectrômetro de massa da Varian-Mat-CH 4. Piracicaba, CENA, Seminário Disciplina Eletrônica Instrumental, 24p. (mimeo.).
- DUNICAN, L.K.; A.B. TIERNEY & F.O'GARA. 1974. Nif. transfer from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*. Washington, Intern. Symposium Nitrogen Fixation.
- EPSTEIN, E. 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, ed. da USP, 341p.
- GALLI, F. 1956. Ocorrência de *Azotobacter chroococcum* em alguns solos de Piracicaba. Rev. Agricultura, 31:145-156.
- GRIFFIN, O.M. 1972. Ecology of soil fungi. Syracuse Univ. Press., 193p.
- GOMES, F.P. 1971. Iniciação à estatística. São Paulo, Livraria Nobel, 3^a ed., 208p.

GROBBELAAR, N.; B. CLARKE & M.C. HOUGH. 1971. The nodulation and nitrogen fixation of isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. III The effect of carbon dioxide and ethylene. *Plant & Soil, Special Volume*:215-223.

HARDY, R.W.F.; R.C. BURNS; R.R. HEBERT; R.D. HOLSTEN & E.K. JACKSON. 1971. Biological nitrogen fixation: A key to world protein. *Plant & Soil, Special Volume*:561-590.

HARDY, R.W.F.; R.C. BURNS & R.D. HOLSTEN. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5:47-81.

HARDY, R.W.F. & R.D. HOLSTEN. 1972. Global nitrogen cycling: polls, evolution, transformations, transfers, quantitation and research needs. In: *The aquatic environment: microbial transformations and water quality management implications*. Washington, Environmental Protection Agency Symposium.

HARDY, R.W.F.; R.D. HOLSTEN; E.K. JACKSON & R.C. BURNS. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-1207.

HATCH, M.D. & C.R. SLACK. 1970. Photosynthetic CO₂-fixation pathways. *Annual Review of Plant Physiology*, 21:141-162.

HAVELKA, U.D. & R.W.F. HARDY. 1974. Legume N₂ fixation as a problem in carbon nutrition. Washington, Intern. Symp. Nitrogen Fixation.

- KATZNELSON, H. 1970. Nature and importance of the rhizosphere. In: Baker, K.F. & W.C. Snyder, ed. Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. California Press., p.187-209.
- KOCH, B. & H.J. EVANS. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol., 41:1748-1750.
- LJONES, T. 1974. The enzyme system. In: Quispel, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., p.618-638.
- MACRAE, I.C. 1975. Assessment of $C_2H_2 : N_2$ molar ratios of detached *Phaseolus vulgaris* nodules using emission spectrometry for $^{14}N : ^{15}N$ determinations. Soil Biol. Biochem., 7:239-240.
- MACURA, J. 1968. Physiological studies of rhizosphere bacteria. In: Gray, T.R.G. & D. Parkinson, ed. The ecology of soil bacteria. Univ. Toronto Press, p.379-395.
- MALAVOLTA, E. 1974. Determinação dos teores totais de macronutrientes em plantas. Piracicaba, ESALQ-USP, Disciplina Nutrição Mineral de Plantas, 6p. (mimeo.).
- MALAVOLTA, E. 1975. Notas do tradutor. In: Epstein, E. Nutrição Mineral das plantas: princípios de perspectivas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos Científicos, ed. da USP, 341p.
- MENDES, W.; P. de O. e C. LEMOS; R.C. LEMOS; L.G. de O. CARVALHO & R.J. ROSEMBURG. 1954. Contribuição ao mapeamento em série, dos solos do Município de Itaguaí. Rio de Janeiro, Inst. Ecol. Exp. Agríc., Bol. nº 12.

MULDER, E.G. & S. BROTONEGORO. 1974. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria. In: Quispel, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., p.37-85.

NEVES, M.C.P.; J.M. DAY; A.M. CARNEIRO & J. DÖBEREINER. 1973. Nitrogenase activity in the rhizosphere of tropical forage grasses. São Paulo, IV Global Impacts Applied Microbiol.

NEVES, M.C.P.; M. NERY & J.M. DAY. 1975. Efeito da temperatura na fixação de nitrogênio de estirpes de *Spirillum* isoladas de *Digitaria* e milho. Campinas, XV Congr. Brasil. Ciência do Solo.

OLIVEIRA, B.A.D. de; P.R. de S. FARIA; S.M. SOUTO; A.M. CARNEIRO; J. DÖBEREINER & S. ARONOVICH. 1973. Identificação de gramíneas tropicais com via fotossintética "C 4" pela anatomia foliar. Pesq. agrop. bras., Sér. Agron., 8:267-271.

OPPENHEIM, J. & L. MARCUS. 1970. Correlation of ultrastructure in *Azotobacter vinellands* with nitrogen source for growth. J. of Bacteriology, 101:286-291.

PEÑA, J.J. & J. DÖBEREINER. 1974. Efecto de nitrato y amonio en la actividad de la nitrogenasa de bacterias tropicales fijadoras de nitrógeno atmosférico. Rev. Lat-amer. Microbiol., 16:33-44.

PERES, J.R.R.; M. NERY & A.A. FRANCO. 1975. Constatação de deficiências de molibdênio em vários solos do Estado do Rio de Janeiro através de teste microbiológico. Campinas, XV Congr. Brasil. Ciência do Solo.

- POSTGATE, J. 1971. The acetylene test for nitrogenase. In: Postgate, J.R., ed. The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. London & New York, Plenum Press, p.311-315.
- POSTGATE, J. 1974. Prerequisites for biological nitrogen fixation in free-living heterotrophic bacteria. In: Quispel, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., p.663-686.
- PRIMAVESI, A.M. & A. PRIMAVESI. 1973. Aumento de nitrogênio no solo pela aplicação semi-aeróbia de palha, fósforo e cálcio. Santa Maria, XIV Congr. Brasil. Ciência do Solo.
- PROKSCH, G. 1969. Routine analysis of ^{15}N in plant material by mass-spectrometry. Plant & Soil, 31:380-384.
- QUISPEL, A. 1974. General introduction. In: Quispel, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., p.1:8.
- RAMOS, O.P.; A.F. de CASTRO & M.N. CAMARGO. 1973. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pesq. Agropec. bras., Sér. Agron., 8:1-27.
- RANKANA, K. 1956. Isotope geology. London, Pergamon Press, 2^a ed., 535p.
- RINAUDO, G.; J. BALANDREAU & Y. DOMMERGUES. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant & Soil, *Special Volume*:471-479.

- ROVIRA, A.D. 1970. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Baker, K.F. & W.C. Snyder, ed. Ecology of soil-borne plant pathogenes. Univ. California Press, p.170-186.
- RUSCHEL, A.P. & D.P.P. de S. BRITTO. 1966. Fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. *Pesq. agropec. bras.*, 1:65-69.
- RUSCHEL, A.P.; Y. HENIS & E. SALATI. 1975. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. *Soil Biol. Biochem.*, 7:181-182.
- SCHOLLHORN, R. & R.H. BURRIS. 1966. *Fed. Proc.*, 25:710. Citado por Postgate (1971).
- STEVENSON, F.J. 1965. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: Bartholomeu, W.V. & F.E. Clark, ed. *Soil Nitrogen*. Wisconsin, American Society of Agronomy, 10:1-42.
- STEWART, W.D.P.; G.P. FITZGERALD & R.H. BURRIS. 1967. In situ studies on N₂-fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58:2071-2078.
- STUTZ, R.C. & L.C. BLISS. 1973. Acetylene reduction assay for nitrogen fixation under field conditions in remote areas. *Plant & Soil*, 38:209-213.
- TRIVELIN, P.C.O.; E. SALATI & E. MATSUI. 1973. Preparo de amostras para análise de ¹⁵N por espectrometria de massa. Piracicaba, CENA, BT-002, 41p.

TROUGHTON, A. 1957. The underground organs of herbage grasses.
Comm. Bureau Past. Field Crops, Bulletin 44:1-163.

VICTORIA, R.L. & E. SALATI. 1975. Uso de $^{15}\text{N}_2$ com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. Piracicaba, ESALQ-USP, Tese de Mestrado, 93p.

VLASSAK, K.; E.A. PAUL & R.E. HARRIS. 1973. Assesment of biological nitrogen fixation in grassland and associated sites. *Plant & Soil*, 38:637-649.

WILSON, G.L. & M.M. LUDLOW. 1970. Net photosynthetic rates of tropical grass and legume leaves. In: Norman, M.J.T., ed. Queensland, XI Intern. Grassland Congress.