

EFEITO DO NITROGÊNIO MINERAL E CALAGEM DO SOLO SOBRE A FIXA
ÇÃO DO NITROGÊNIO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

ROSA MARIA FERREIRA VIANNA PEREIRA
UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

ORIENTADORA: PROFA.DRA. ELKE J.B.N. CARDOSO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril-1979

A

meus pais

meus irmãos Cristina e Manoel Luiz

meu esposo José Odair

e ao Luiz Fernando.

A G R A D E C I M E N T O S

Expressamos nossos agradecimentos:

- A Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pelo estímulo e orientação segura.
- Ao Dr. Ferdinando Galli pelas facilidades concedidas junto ao Departamento de Fitopatologia.
- Ao esposo e amigo José Odair Pereira pela compreensão, estímulo e correção do manuscrito.
- Aos Professores que participaram da nossa formação científica.
- Ao Prof. Isaias Olívio Geraldi e ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na pessoa do Dr. Francisco A. de Moura Duarte pela orientação e execução das análises estatísticas.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas na pessoa do Dr. Luiz D'Artagnan de Almeida pelas sementes concedidas.
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pelos serviços prestados.
- À Universidade do Amazonas pelos Auxílios e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. pH do solo	06
3.2. Nitrogênio	12
3.3. Métodos na fixação de nitrogênio	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Solo	20
4.2. Inoculantes	21
4.3. Meios de cultura	21
4.3.1. Meio líquido	21
4.3.2. Meio sólido	22
4.3.3. Solução Tampão de McIlvaine	22
4.3.3.1. Solução de fosfato dissódico.	22
4.3.3.2. Solução de ácido cítrico	22
4.4. Planta hospedeira e solução nitritiva	23
4.5. Experimentos realizados.....	24
4.5.1. Experimento I	24
4.5.2. Experimento II	26
4.5.3. Experimento III	27
4.5.4. Experimento IV	30
4.5.5. Coleta de dados	31

4.5.5.1. Peso seco da planta e peso se <u>co</u> dos nódulos	32
4.5.5.2. Determinação do Nitrogênio ..	32
4.5.5.3. Determinação da atividade da nitrogenase	32
4.5.6. Análise dos dados	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Experimento I	35
5.1.1. Peso seco da parte aérea das plantas..	35
5.1.2. Porcentagem de Nitrogênio da parte a <u>é</u> rea das plantas	36
5.1.3. Nitrogênio total da parte aérea	36
5.1.4. Peso seco dos nódulos	37
5.1.5. Acetileno reduzido	37
5.2. Experimento II	40
5.2.1. Peso seco da parte aérea das plantas..	40
5.2.2. Porcentagem de Nitrogênio na parte a <u>é</u> rea das plantas	40
5.2.3. Nitrogênio total da parte aérea	41
5.2.4. Peso seco dos nódulos	41
5.2.5. Acetileno reduzido	41
5.3. Experimento III.....	44
5.3.1. Peso seco da parte aérea das plantas..	44
5.3.2. Porcentagem de Nitrogênio na parte a <u>é</u> rea das plantas	44

5.3.3. Nitrogênio total da parte aérea	45
5.3.4. Peso seco dos nódulos	45
5.3.5. Acetileno reduzido	46
5.4. Experimento IV	49
6. DISCUSSÃO.....	50
6.1. Experimento I	50
6.2. Experimento II	53
6.3. Experimento III	60
7. CONCLUSÕES	65
8. SUMMARY	67
9. LITERATURA CITADA	69

LISTA DE TABELAS E FIGURA

TABELA:	Página
01 - Análise química do solo Latossol Roxo "série Luiz de Queiróz".....	20
02 - Análise química do solo Regossol "série Ribeirão Claro"	21
03 - Alíquotas de solução tampão usadas para ajustar o valor de pH em meio de cultura	23
04 - Quantidades de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ usadas para ajustar os níveis de pH do solo Regossol "série Ribeirão Claro"	28
05 - Experimento I : Valores obtidos pelo teste F, da análise de variância dos dados de Nitrogênio total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C_2H_2 reduzido/h.g de tecido nodular	38
06 - Experimento I : Médias de Nitrogênio total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco dos nódulos (g) e C_2H_2 reduzido/h.g de tecido nodular (μM). Médias comparadas pelo tes	

te Tukey.....	39
07 - Experimento II : Valores obtidos pelo teste F, da análise de variância dos dados de Nitrogênio total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de Nódulos e C ₂ H ₂ reduzido/h.g de tecido nodular.....	42
08 - Experimento II : Médias de Nitrogênio total (g) , Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco dos nódulos (g) e C ₂ H ₂ reduzido/h.g de tecido nodular (μM). Médias comparadas pelo teste Tukey.....	43
09 - Experimento III: Valores obtidos pelo teste F, da análise da variância dos dados de Nitrogênio total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C ₂ H ₂ reduzido/h.g de tecido nodular.....	47
10 - Experimento III: Médias de Nitrogênio total (g) , Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C ₂ H ₂ reduzido/h.g de tecido nodular (μM). Médias comparadas pelo teste Tukey.....	48
11 - Experimento IV : Número médio de talos/bacterias/ml de meio de cultura, para as estirpes estudadas.....	

dadas 49

FIGURA:

01 - Curva de Calagem para o solo Regossol "série Ri
beirão Claro" 29

1. RESUMO

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação visando-se verificar a influência que modificações na composição química do solo tais como, variação do pH e introdução de fertilizantes nitrogenados, pudessem ter na eficiência simbiótica das estirpes CO5, CO9 e Cl3 de *Rhizobium phaseoli* em *Phaseolus vulgaris*, cultivar Carioca.

No primeiro experimento, feito em Latossol, em pregaram-se doses de zero, 10, 15, 20 e 30 ppm de N na forma NH_4NO_3 e observou-se que o nitrogênio mineral na dose de 30 ppm, juntamente com o nitrogênio fixado simbioticamente, produziu melhores resultados. Areia de rio lavada foi o substrato empregado no segundo experimento, e as doses foram de zero, 15, 20, 40 e 60 ppm de N na forma NH_4NO_3 . Neste caso as maiores doses foram as que produziram os melhores resultados sendo este fato atribuído à ausência de nitrogênio residual no substrato. De qualquer maneira a adubação nitrogenada favoreceu as estirpes estudadas.

No terceiro experimento usou-se solo Regossol com pH inicial de 4,5 que foi levado a níveis superiores pela adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chegando-se a valores de 5,5, 6,5 e 7,5. A calagem do solo favoreceu a eficiência das estirpes, proporcionou maior produção de matéria seca e maior acúmulo de N foliar.

Também foi realizado, "in vitro", um outro experimento em que se objetivou estudar a influência do pH do meio sobre as estirpes. Observou-se melhor crescimento em pH próximo à neutralidade mas estes dados foram considerados de difícil extrapolação para o solo onde fatores mais complexos estão envolvidos.

2. INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio é um processo de grande importância na agricultura.

Devido ao papel essencial que as bactérias do gênero *Rhizobium* ocupam na fixação simbiótica do nitrogênio, há um crescente interesse no estudo dos processos e fatores envolvidos na associação de microorganismos deste gênero e plantas leguminosas.

Estudos com estes simbiontes começaram a ser feitos há mais de cem anos, com as observações de BOUSSING GAULT em 1838, que mostraram que as leguminosas podiam se utilizar de nitrogênio atmosférico. Estas observações foram confirmadas mais tarde por HELLRIEGEL e WILFARTH (1888), que através de um experimento com ervilhas, demonstraram que as nodulações se formavam a partir da invasão da bactéria do solo (STEWART, 1966).

Como o nitrogênio é um elemento essencial à vida dos organismos, e a escassez da proteína é um problema da inadequada redução do nitrogênio à amônia, nos dias a

tuais tornou-se ainda mais importante conhecer e controlar todos os fatores que influem nesta associação simbiótica pois a fixação industrial tornou-se um processo oneroso.

Dentre as leguminosas o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é de grande importância, constituindo base energética e proteica na alimentação brasileira, sendo seu consumo estimado em 68g/dia/habitante, (MEDINA e MIYASAKA, 1972). Entretanto, considera-se ainda hoje que o feijoeiro obtém pouco benefício na simbiose com o *Rhizobium*. O que talvez contribua para a baixa eficiência na simbiose, seja a susceptibilidade do *Rhizobium phaseoli* às condições desfavoráveis do solo ou da planta.

Assim, o presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar se modificações na composição química do solo, como por exemplo, variação de pH e introdução de fertilizantes, podem aumentar expressivamente a eficiência fixadora de algumas estirpes de *Rhizobium phaseoli*, no cultivar Carioca.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Em termos de agricultura, as leguminosas tem contribuído em maior escala para a aquisição do nitrogênio. Sem dúvida nenhuma a simbiose *Rhizobium*-leguminosas é uma associação extremamente evoluída, fixando em termos globais cerca de 55-140 kg de N₂/ha/ano, porém, sabe-se que valores bem maiores podem ser obtidos (QUISPEL, 1974).

Descrevendo o ciclo do nitrogênio, DELWICHE (1970), deu grande importância aos mecanismos de fixação biológica do nitrogênio atmosférico, apontando-os como uma das principais fontes de nitrogênio utilizáveis pela planta, embora dê também grande ênfase às crescentes cifras representadas pela fixação industrial.

A grande influência do ambiente na fixação simbiótica do nitrogênio já foi há muito tempo evidenciada. A resposta da simbiose ao ambiente é determinada pela constituição genética e fisiológica da planta. Entretanto, observou-se que modificações foram obtidas de acordo com a linhagem de

Rhizobium usada (PATE, 1961; PATE e DART, 1961). Portanto, pode-se ter maior eficiência simbiótica usando-se variedades seleccionadas de planta, assim como estirpes de *Rhizobium* de maior eficiência sob ambiente adequado. São várias as características ambientais que interferem na simbiose *Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseoli*, tais como pH do solo, elementos minerais, temperatura, nível de nitrogênio combinado e outros.

3.1. pH do solo

Dentre as características do solo, a influência do pH na fixação do nitrogênio é de muita importância agrícola, visto que os solos tropicais apresentam valores de pH baixo. O potencial hidrogeniônico do solo pode ser defininido sob vários termos, como concentração hidrogeniônica, reação do solo, acidez trocável, e cada um desses termos se refere à medida de acidez sob várias formas.

As variações de pH podem exercer influência em uma série de fatores que incluem:

a) inibição de processos enzimáticos, porque as enzimas são particularmente sensíveis às variações de pH.

b) Transformações de nitrogênio pelas plantas quando o nitrogênio na forma nítrica (NO_3) é convertido ã forma amoniacal (NH_3).

c) distúrbios no balanço de minerais e seu e quilíbrio iônico existente, afetando o metabolismo da planta.

d) toxidez pela presença de alumínio solúvel em condições muito ácidas.

Para que se tenha uma idéia da influência do pH nas características do solo, são citados alguns trabalhos que evidenciam a complexidade desse estudo. PRAT (1961) estudando a influência do pH na capacidade de troca catiônica, (CTC) concluiu que ela varia em função do pH. Consequentemente pode-se esperar que determinadas faixas de pH favoreçam a disponibilidade de certos nutrientes e prejudicam outros. PRAT (1966) observou também que a carga negativa nos solos é neutralizada pelos cátions carregados positivamente: Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , H^+ e Al^{+++} . BRAUNER *et alii* (1966), completando os trabalhos de PRAT, observaram que solos muito ácidos (pH menor que 5,0), de regiões úmidas, podem conter uma grande quantidade de alumínio trocável. Os problemas acarretados pela forma Al^{+++} trocável são bastante graves, podendo causar toxidez às culturas.

Os efeitos adversos dos solos ácidos na fixação de nitrogênio nas leguminosas não podem ser atribuídos só à concentração de íons H^+ , mas a alguns efeitos indiretos como a deficiência de cálcio, magnésio ou molibidênio, ou aos efeitos tóxicos do alumínio solúvel e do manganês. A sensibilidade de muitas leguminosas a solos ácidos poderia ser ex

plicada pelo efeito específico da toxidez do manganês na fixação simbiótica do nitrogênio (DÖBEREINER, 1966).

× LIE (1971) observou que a diminuição do crescimento de leguminosas em solos ácidos é principalmente devido à sua incapacidade de formar nódulos nessas condições. Anteriormente, este fato foi atribuído à sensibilidade do *Rhizobium* à acidez, mas em recente revisão este autor notou que a iniciação do nódulo foi inibida em meio ácido.

Estudando a aplicação de diferentes doses de carbonato de cálcio no solo, SERVIN (1971) observou que o aumento deste material reduz os teores de H^+ trocável e a redução é tanto maior, quanto maiores forem as quantidades de $Ca CO_3$ empregadas. O mesmo não ocorre, porém, para o alumínio trocável, que muitas vezes permanece em doses que ainda podem ser tóxicas às culturas (citado por HOYT e TURNER, 1975).

MUNNS *et alii* (1977) estudando a influência da calagem na fixação de nitrogênio verificaram que a calagem em níveis superiores a 22 ton/ha diminui a porcentagem de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. Nestas plantas o decréscimo do nitrogênio foliar coincidiu com o aumento no crescimento e produção. Houve aumento no número de nódulos e aumento correspondente no nitrogênio foliar quando, através da calagem, elevou-se o pH para 6,0. Acima deste valor ocorreu decréscimo na porcentagem de nitrogênio foliar para menos de

5% e não se observou superioridade no crescimento da planta e nas características do nódulo. Estes autores concluíram que o aumento observado no crescimento não foi devido ao efeito da calagem sobre a fixação do nitrogênio, mas ao seu efeito sobre outro fator, como por exemplo toxidez de metais pesados, os quais foram superados após calagem.

NORRIS propôs que a questão de calagem, em relação à inoculação de leguminosas, seja revista, quando se trata de leguminosas tropicais e que a suposição de que um solo necessita calagem só porque é ácido pode levar a conclusões muito precárias (citado por DÖBEREINER *et alii*, 1966).

Em soja, DÖBEREINER *et alii* (1966) mostraram que a adição de cálcio, como invólucro da semente, pode substituir uma calagem maciça do solo quando se tem variedades e estirpes selecionadas. Usando um solo não muito ácido estes autores observaram que a calagem aumentou muito o peso seco da planta e que este efeito, provavelmente, deve ser atribuído a redução da absorção do manganês que atinge concentrações tóxicas nas plantas em solos sem calagem, sendo que o mesmo efeito já havia sido verificado em feijão. Realmente WELSH e NELSON (1950) afirmaram que o grau de saturação de cálcio e manganês do solo é mais importante que o pH do mesmo, no que diz respeito à fixação simbiótica do nitrogênio em soja. No feijoeiro, FRANCO e DÖBEREINER (1967), usando

dois cultivares, viram que o cultivar Rico 23 foi capaz de nodular em solo ácido com toxidez de manganês, enquanto outro cultivar não foi.

RICE (1975) verificou que quando suficiente CaCO_3 foi aplicado no solo (4mg CaCO_3 /g de solo) para reduzir o alumínio solúvel a níveis subtóxicos, aumentou o rendimento relativo com e sem nitrogênio, da alfafa.

Em feijão, ALMEIDA *et alii* (1973) verificaram que a aplicação de calcário em solo com pH 5,5 aumentou o peso seco dos nódulos de 70%.

Nessa mesma cultura, GOEPFERT e FREIRE (1973) observaram que a calagem total favoreceu a produção de matéria seca, mas quando em pequena dose não foi suficiente para reduzir o manganês e o alumínio a níveis não tóxicos para o desenvolvimento do feijoeiro e elevar o pH o necessário para uma boa nodulação. A calagem também favoreceu o aumento da fixação do nitrogênio.

Respostas significativas à calagem, na fixação do nitrogênio, foram verificadas por RUSCHEL *et alii* (1966). Segundo estes autores os aumentos observados, no nitrogênio total e no número de nódulos, foram devidos a efeitos indiretos da calagem que, corrigindo o pH do solo, possibilitaram a adsorção de outros elementos, tais como cálcio e magnésio.

Quanto à produção de matéria seca, BANATH *et alii* (1966) e MUNNS *et alii* (1977) afirmaram que plantas noduladas que cresceram em níveis de pH inferiores ao pH ótimo foram menos produtivas em matéria seca do que as desenvolvidas em pH ótimo.

Apesar de ser bem conhecida a influência da acidez do solo na distribuição e crescimento das leguminosas, não se deve estudá-la como fator isolado mas em associação simbiótica, porque os dados observados são resultados da ação da acidez do meio na planta e na bactéria. Deve-se considerar que a ação ácida no ambiente microbiano é um fator importante influenciando a ecologia de *Rhizobium* spp.

HOLDING e LOWE (1971), afirmaram que a influência da acidez do solo na sobrevivência de *Rhizobium* deve ser estudada sobre dois aspectos: primeiro, a intensidade de acidez do solo e segundo, a relação entre a habilidade de tolerar acidez e eficiência da estirpe.

De acordo com van SCHREVEN (1972), a especificidade do *Rhizobium* é alterada em níveis de pH baixos. Replicando repetidamente o *Rhizobium* em meio de ágar com valores de pH variando de 3,5 - 7,0, ocorre diminuição do crescimento a partir de valores inferiores a 4,5. Plantas inoculadas com estirpes mantidas a este pH apresentaram-se pouco noduladas.

RUSCHEL *et alii* (1962) observaram que o desen

volvimento de *Rhizobium phaseoli* no meio de cultura não é prejudicado pelo aumento da concentração de ions H^+ até pH 5,5 e que concentrações de cálcio de 0,6 mE/l foram suficientes para o bom desenvolvimento da bactéria.

Hã, entretanto, poucos dados na literatura a respeito da reação de culturas puras em relação à reação do solo de onde estas culturas foram isoladas. Não se encontraram dados suficientes que evidenciassem a tolerância ácida do *Rhizobium* em culturas puras, e que confirmassem que só ions H^+ , e não outros fatores, sejam responsáveis pelo controle do crescimento ou desenvolvimento.

3.2. Nitrogênio

Inúmeros pesquisadores, estudando o efeito do nitrogênio mineral na nodulação de leguminosas, demonstraram que eficiência simbiótica máxima está relacionada com o desenvolvimento em meio deficiente de nitrogênio (WILSON, 1940 e NUTMAN, 1956).

Antes que a simbiose se estabeleça a planta hospedeira pode passar por um período de escassez de nitrogênio. A formação de nódulos e a atividade da fixação de nitrogênio são muito reduzidas na presença de grandes doses de nitrogênio combinado. Pequenas quantidades de fertilizantes nitrogenados são benéficas para todo o crescimento da planta

e isto se deve à necessidade de cobrir o período de deficiência de nitrogênio que ocorre antes que os nódulos se tornem ativos e para que se desenvolva o tecido nodular (LIE,1974).

WILSON (1940), observou que o efeito inibitório na nodulação ocorria quando nitrogênio combinado era aplicado às raízes. Este efeito pode ser atenuado aumentando-se a fotossíntese ou fornecendo-se uma fonte de carbono à planta. O autor atribui esse efeito ao fato de que a relação carbono-nitrogênio governa a formação de nódulo e a fixação de nitrogênio. Verificou ainda que a relação C:N baixa reduz a formação do nódulo e a fixação do nitrogênio.

RAGGIO *et alii* (1965) observam que nitrato suprido ao meio externo é inibitório para a nodulação mas não o é quando é fornecido ao meio interno e eles descartam a hipótese que a relação C:N regula a nodulação. No entanto outra explicação foi dada por CARTWRIGHT (1967) que afirmou que o efeito inibitório do nitrato é devido ao fato de que ele é menos facilmente absorvido quando no meio interno do que pelas raízes.

De acordo com THORNTON a inibição induzida pelo nitrato é devida à redução do número de pelos absorventes formados (citado por LIE, 1974).

Todos os estágios do processo de nodulação parecem ser inibidos em presença de concentrações moderadas de nitrato, nitrito e uréia, o que foi evidenciado pelo reduzi

do número de infecções, tempo de aparecimento do primeiro nódulo e pelo número e peso dos nódulos formados, nos experimentos de GIBSON e NUTMAN (1960).

ALLOS e BARTHOLOMEW (1959), afirmaram que nitrogênio combinado, quando fornecido para a planta nodulada é absorvido rapidamente pela planta com concomitante redução da fixação de nitrogênio. O grau de inibição depende da concentração e forma do composto nitrogenado, do tipo da planta hospedeira e da estirpe de bactéria usada.

O aumento observado nos nódulos é resultante segundo PATE e DART (1961), de pequenas quantidades de fertilizantes nitrogenado fornecido inicialmente, e, então, maior quantidade de nitrogênio pode ser fixada pela planta.

Estes estudos mostram que pequenas doses de nitrogênio mineral favorecem a fixação de nitrogênio pelo *Rhizobium*. Assim, GUSS *et alii* (1972) constataram que a aplicação de pequenas doses de nitrogênio (23 ppm na forma de NH_4NO_3) aumentaram a nodulação no feijoeiro, sendo que esse efeito foi observado nos tratamentos com nitrogênio aplicado no plantio e 20 dias após o plantio. Estes dados estão de acordo com os de ALLOS e BARTHOLOMEW (1955), que verificaram que adubações nitrogenadas até 37 ppm não diminuíram a fixação de nitrogênio, mas o fizeram em concentrações maiores.

PATE e DART usaram 2,5 mg N/planta e esta dose se mostrou adequada à fixação simbiótica pelo *Rhizobium*. Foi verificado, também por esses autores, que aplicação de nitrogênio aos dez dias após a sementeira, em *Medicago tribuloides* Ders., proporcionou fixação máxima de nitrogênio, maior produção de tecido nodular e maior eficiência do nódulo (citado por GUSS e DOBEREINER, 1972).

ALMEIDA *et alii* (1973) verificaram que a produção de feijoeiro mostrou ser influenciada significativamente pela aplicação de nitrogênio mineral. O aumento na produção foi da ordem de 51,6% e 47,7% em relação, respectivamente, ao tratamento inoculado e à temperatura sem nitrogênio e sem *Rhizobium*.

Nessa mesma cultura, FRANCO e DOBEREINER (1968), observaram que doses de 10 ppm de nitrogênio aumentaram a nodulação enquanto que doses maiores foram altamente prejudiciais à nodulação. Estes dados variaram de acordo com a variedade de feijão e com o nível de cálcio no solo, ocorrendo interdependência de N/Ca.

O que se nota nesses estudos, é que, com o decorrer do tempo e apesar de novas pesquisas serem realizadas, os dados se apresentaram conflitantes entre si.

BURTON *et alii* (1961) observaram, em feijoeiro, que certo suprimento de nitrogênio na forma combinada au

mentou a fixação do nitrogênio.

MIYASAKA e MASCARANHAS (1963), nessa mesma cultura, notaram que com a aplicação de nitrogênio mineral, o índice de nodulação foi em regra muito baixo e, embora relativamente maior nos tratamentos em que se retardou a adubação nitrogenada, não impediu que, neles, a produção caísse consideravelmente.

O mesmo encontrou RUSSELL (1950), pois afirma que a adubação nitrogenada reduz a formação de nodosidades, nas raízes das leguminosas e, portanto, sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

Estes dados foram confirmados nos trabalhos de RUSCHEL e REUZER (1973), em feijão, onde observaram que nitrogênio combinado aumentou o processo de fixação e o nitrogênio, mas diminuiu o peso dos nódulos e a quantidade de acetileno reduzido por nódulos exisados.

Deve-se ressaltar que estirpes de *Rhizobium* podem diferir em suas reações ao nitrogênio combinado.

3.3. Métodos na fixação de nitrogênio

Apesar da grande importância da fixação de nitrogênio existem poucas informações precisas que definam quantitativamente como ela ocorre na biosfera, assim como se sabe pouco a respeito do efeito de diversas práticas agrícolas

aplicadas à fixação de nitrogênio. Estes fatos provavelmente podem ser atribuídos à ausência de métodos eficientes para medidas quantitativas da fixação de nitrogênio (STEWART *et alii*, 1967).

Vários métodos podem ser usados em laboratório para avaliar a fixação de nitrogênio, e que são descritos por HARDY *et alii* (1968). Tais métodos são: análise pelo método de Kjeldahl, enriquecimento com ^{15}N e que é ensaiado por espectrofotômetro de massa e incorporação de ^{13}N ensaiado por contagem de radioatividade. Ainda, segundo estes autores, estes métodos são relativamente insensíveis com exceção do método que usa ^{13}N , embora sua aplicação seja extremamente limitada devido ao fato de possuir meia vida curta (10 minutos).

A análise através do método de Kjeldahl vem sendo muito usado para avaliar a fixação do nitrogênio, BURRIS e WILSON (1957), mas alguns pesquisadores (HARDY *et alii*, 1968; STEWART *et alii*, 1967) consideram este método insensível e demorado.

Com a descoberta feita por NAUDE, do isótopo do nitrogênio de massa 15, foi possível a introdução deste método para o estudo da fixação do nitrogênio (citado por VICTÓRIA, 1975).

THODE e UREY (citados por BERGERSEN, 1973), foram os primeiros a conseguir compostos enriquecidos com ^{15}N

como traçador e BURRIS *et alii* (1972), foram os primeiros a dar uma descrição completa de um experimento utilizando ^{15}N na fixação biológica do nitrogênio.

HAUCK (1971), fez uma revisão sobre o campo de estudos e sobre o número de trabalhos publicados entre 1942 e 1968, e que se utilizaram de ^{15}N como traçador. O autor considera que uma das principais limitações do uso do ^{15}N como traçador é o seu alto preço e há necessidade de serem desenvolvidos novos métodos que possam simplificar e reduzir o custo de experimentos com tal isótopo.

Os organismos que fixam nitrogênio molecular também reduzem acetileno a etileno (KOCH e EVANS, 1966). As concentrações de ambos os gases são facilmente determinadas, por cromatografia de gás e este método vem sendo usado, considerando-se que existe uma relação constante entre a quantidade de etileno produzido e a quantidade de nitrogênio fixado e que o etileno produzido durante o ensaio, não seja alterado biológica ou abiologicamente durante o período de incubação (FLETT *et alii*, 1975). Contudo, estes autores notaram que a aplicação da técnica da redução de acetileno pode acarretar erros em certos estudos de ambientes aquáticos e terrestres. Isto se deve à observação de que certos microorganismos oxidadores de metano podem transformar também o etileno ao ponto de a redução do acetileno não possa ser realmente

te empregada. Além disso, durante a redução do nitrogênio pela nitrogenase, ocorre evolução do hidrogênio pelas reações desta enzima, assim como retirada de H_2 pela hidrogenase e estes fatores possivelmente estão envolvidos na eficiência do processo de fixação (SCHUBERT *et alii*, 1977). Para estes pesquisadores o maior problema está relacionado com o papel destas duas reações de H_2 na capacidade de fixação do nitrogênio e nas medidas de rendimento da planta. Sabe-se também que o acetileno é um inibidor das reações que envolvem H_2 e que também inibe algumas hidrogenases. Por isso, o acetileno pode reduzir efetivamente a atividade total da nitrogenase eliminando a reciclagem de H_2 assim como seu uso como fonte de energia para a fixação de nitrogênio. Sugerem que por este motivo, a técnica da redução do acetileno deve ser usada com certo cuidado na interpretação de resultados.

De acordo com SAITO (1978), a medida da fixação de nitrogênio, pela técnica da redução do acetileno, é precisa, mas devem-se tomar alguns cuidados para diminuir os possíveis erros experimentais. A autora concluiu que é preciso padronização na amostragem, no tempo e temperatura de incubação, uso de padrão adequado de C_2H_4 e tempo de armazenamento da amostra para cromatografia, entre outros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz".

4.1. Solo

As plantas tiveram como substrato o solo Latossol Roxo "série Luiz de Queiróz" no primeiro experimento, areia de rio lavada no segundo e solo Regossol "série Ribeirão claro" no terceiro experimento.

A análise química do solo revelou a composição apresentada nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 : Análise química do solo Latossol Roxo "série Luiz de Queiróz".

pH	% carbono	PO ₄ ⁻³	K	N	%M.O.
6,0	1,3	0,04	0,06	0,08	0,62

Tabela 2 : Análise química do solo Regossol "série Ribeirão Claro".

pH	% Carbono	PO ₄ ⁻³	K	N	% M.O.
4,5	0,36	0,03	0,03	0,07	0,62

4.2. Inoculantes

Selecionaram-se as estirpes C05, C09 e C13 de *Rhizobium phaseoli*, provenientes de Piracicaba (SP), Santa Bárbara D'Oeste (SP) e Piracicaba (S.P.), respectivamente, devido à sua maior eficiência simbiótica em relação ao *Phaseolus vulgaris*, variedade Carioca, determinada em um experimento prévio de seleção de estirpes com 3 cultivares de feijão e onze estirpes de *R. phaseoli*.

4.3. Meios de Cultura

4.3.1. Meio Líquido

Caldo de levedura e manitol (Yeast-Manitol Broth-YMB) de VINCENT (1970), modificado.

Este meio foi utilizado no experimento IV e inclui: KH₂PO₄ 0,5g, substituído por Na₂HPO₄ 0,1g, MgSO₄

7H₂O 0,2g, NaCl 0,1g, substituído por KCl 0,5g, Manitol 0,5g extrato de levedura 0,5g e água destilada 1000 ml. Adicionaram-se ainda 5 ml de azul de Bromotimol (solução alcoólica - 5%) com a finalidade de se observar variação de pH do meio durante o crescimento. O meio foi autoclavado à 120°C por 15 minutos.

4.3.2. Meio Sólido

Levedura-Manitol-Agar (Yeast-Manitol-Agar - YMA). Ao meio líquido foram adicionados 15,0g de Agar/l.

4.3.3. Solução tampão de McIlvaine (fosfato dissódico e ácido cítrico), segundo citação de ASSUMPÇÃO e MORITA (1968), com algumas modificações.

4.3.3.1. Solução de fosfato dissódico

Na₂HPO₄ 17,814 g
 Água destilada 1.000 ml

4.3.3.2. Solução de ácido cítrico

C₆H₈O₇ 21,008 g
 Água destilada 1.000 ml

As soluções foram conservadas em refrigerador a 4°C.

A solução tampão foi preparada de acordo com o valor de pH requerido para o meio de cultura, como segue, na Tabela 3.

Tabela 3 : Alíquotas de solução tampão usadas para ajustar o valor de pH em meio de cultura.

pH	Na ₂ HPO ₄ (ml)	ácido cítrico (ml)
4,6	0,40	19,60
5,5	9,86	10,14
6,5	19,45	0,55

4.4. Planta hospedeira e solução nutritiva

A planta hospedeira foi o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Carioca, fornecido pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas.

A solução nutritiva usada foi a de NORRIS (1964), isenta de nitrogênio. A composição desta solução é da abaixo, para 1 litro:

KCl	149 mg
KH ₂ PO ₄	348 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	483 mg

$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	688 mg
FeSO_4(5% P/V).....	5 ml
Ácido cítrico ... (5% P/V).....	

Micronutrientes*

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9,2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	78,5 mg
H_3BO_3	1428,3 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}^{**}$	2023,3 mg
H_2O	1000,0 ml

* Foram usados 0,5 ml da solução de micronutrientes.

** Substituiu-se por $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1690 mg.

Para os vasos com adubação nitrogenada empregaram-se NH_4NO_3 em doses que variaram de 10 a 60 ppm.

4.5. Experimentos realizados

Foram realizados quatro experimentos, sendo três instalados em casa de vegetação e um em laboratório.

4.5.1. Experimento I : Efeito de diferentes doses de nitrogênio mineral, em Latossol, sobre a fixação simbiótica do nitrogênio em feijão com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições e os seguintes tratamentos:

- a) Testemunha inoculada sem adubação nitrogenada.
- b) Testemunha não inoculada com adubação nitrogenada (15ppm).
- c) Plantas inoculadas e adubadas com diferentes doses de nitrogênio.

Empregaram-se as doses de 10, 15, 20 e 30 ppm de nitrogênio na forma de NH_4NO_3 , aplicadas em doses parceladas no plantio e 20 dias após o plantio.

O esquema experimental foi fatorial de $3 \times 5 \times 1$, para estirpe, dose de nitrogênio e variedade.

Utilizaram-se vasos plástico, com capacidade para 2,5 kg de solo, previamente esterilizados com solução a 10% de lysoformio e depois lavados com água destilada.

Neste experimento usou-se solo Latossol Roxo "série Luiz de Queiróz" mais 1/3 de areia de rio lavada, sendo que a mistura foi autoclavada por vapor fluente durante duas horas.

A irrigação foi feita com água destilada e a adubação foi feita com solução nutritiva isenta de nitrogênio, duas vezes por semana, e aplicada através de tubos colocados no centro dos vasos. Esse sistema de irrigação foi usado por ZEMELMAN *et alii* (1964).

As sementes de feijão foram esterilizadas superficialmente, durante 15 minutos, com hipoclorito de sódio comercial a 5%, diluído 1:5. Posteriormente as sementes foram lavadas em água destilada por 12 horas, procedendo-se então à sementeira que foi feita em agosto de 1978. Cada vaso recebeu dez sementes e após uma semana foi feito o desbaste, deixando-se cinco plantas por vaso. A inoculação foi feita nos seedlings com uma suspensão de células bacterianas de *Rhizobium phaseoli* numa concentração aproximada de 10^6 células/ml, aplicando-se cinco ml por vaso. Estas células bacterianas provieram de um tubo de ensaio contendo cultura de *Rhizobium* com sete dias de crescimento a 28°C , suspensos em cinco ml de água esterilizada.

Decorridos 41 dias da sementeira as plantas foram retiradas, e para isso cortou-se o caule na altura da superfície do solo. Em seguida, os vasos foram virados sobre folhas de papel para retirada das raízes, sendo então lavadas em água de torneira, para facilitar a remoção dos nódulos. As raízes e a parte aérea das plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel manteiga e colocadas para secar, em estufa ventilada a 60°C .

4.5.2. Experimento II : Efeito de diferentes doses de nitrogênio mineral, em areia de rio lavada, sobre a fixa

ção simbiótica do nitrogênio em feijão com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

O experimento foi instalado em cada de vegetação em blocos ao acaso com quatro repetições e os seguintes tratamentos:

- a) Testemunha inoculada, sem adubação nitrogenada.
- b) Testemunha não inoculada, com adubação nitrogenada (15ppm).
- c) Plantas inoculadas e adubadas com diferentes doses de nitrogênio.

A sêmeadura foi feita em agosto de 1978 e a retirada das plantas foi feita decorridos quarenta dias.

A adubação nitrogenada foi parcelada sendo feita no plantio e 20 dias após o plantio e foram empregadas doses de 15, 20, 40 e 60 ppm de nitrogênio, na forma de NH_4NO_3 . O esquema experimental foi fatorial de 3X5X1 para estirpe, dosas de nitrogênio e variedade.

No mais, seguiu-se o mesmo procedimento empregado no experimento anterior.

4.5.3. Experimento III : Influência de diferentes níveis de calagem do solo na fixação simbiótica do nitrogênio em feijão com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições. O esquema fatorial foi de 3X4X1 para estirpe, pH e variedade. Os valores de pH do solo fo

ram de 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5. Empregou-se solo Regossol "série Ribeirão Claro" com pH inicial de 4,5. O aumento do pH inicial para níveis superiores foi feito com hidróxido de cálcio de acordo com a determinação de calcário deste solo, feita previamente do seguinte modo:

a) preparou-se a série tampão de hidróxido de cálcio de zero a cinco equivalentes miligrama. Como este solo tem acidez total próximo a 2,5 emg, esta série tampão é suficiente para elevar o pH ao redor de sete.

b) pesou-se 100 g de terra fina seca ao ar (TFSA).

c) o solo foi incubado com a série tampão com 60% de saturação de água, por 10 dias, quando então foi feita a curva de calagem do solo (Figura 1) de acordo com os dados da Tabela 4.

Tabela 4 : Quantidades de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ usadas para ajustar os níveis de pH do solo Regossol "série Ribeirão Claro"

emg $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Leitura de pH
0	4,50
1	5,65
2	6,70
3	7,80
4	8,40
5	8,65

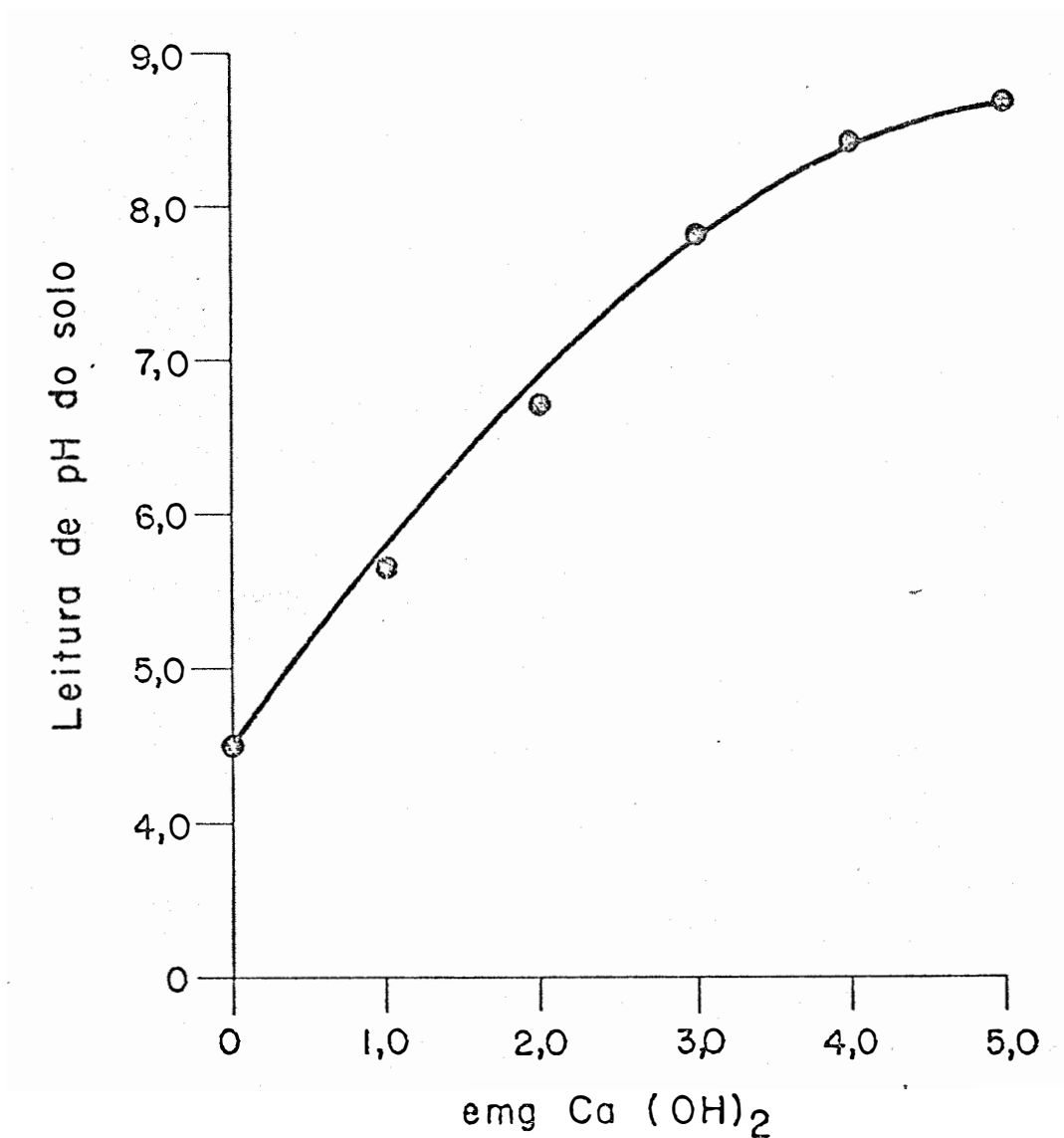


Figura 1 : foi feita com os dados apresentados na Tabela 4.

Na casa de vegetação, depois que se adicionou hidróxido de cálcio, deixou-se o solo em repouso por uma semana, com teor de umidade próximo à capacidade máxima de retenção. Depois deste período fez-se a semeadura, em setem

bro de 1978, e as plantas foram retiradas após 30 dias. No mais, seguiu-se o mesmo esquema dos experimentos anteriores.

4.5.4. Experimento IV : Influência de diferentes níveis de pH do meio de cultura no crescimento de três estirpes de *R. phaseoli* "in vitro".

Com o objetivo de se acompanhar "in vitro" o crescimento bacteriano sob influência de vários valores de pH este experimento foi instalado em condições de laboratório em meio líquido de levedura de VINCENT (1970), modificado de acordo com o indicado no item 4.3.1. Este meio teve que sofrer modificações para que cada elemento químico permanesse em concentração semelhante à indicada por VINCENT (1970) após a adição de solução tampão. O tampão fosfato dissódico-ácido cítrico foi escolhido porque apresenta ampla faixa de variação de pH. Entretanto, após a autoclavagem do material, o pH do meio não se manteve sendo preciso usar alíquotas de solução tampão diferentes das indicadas por ASSUMPTÃO e MORITA (1968), para se chegar aos valores desejados, que neste caso foram de 4,5; 5,5 e 6,5. Adicionou-se o corante azul de bromotimol ao meio líquido para se ter maior controle de possíveis variações do pH do meio durante o crescimento bacteriano.

Cincoenta mililitros do meio tamponado nos di

versos níveis de pH foram inoculados com as estirpes C05, C09 e C13 de *R. phaseoli* resultando 12 combinações diferentes que foram ensaiadas três vezes. A seguir os meios inoculados foram agitados à temperatura ambiente e no 7º dia retirou-se amostras de um ml as quais sofreram dez diluições em nove ml de água destilada esterilizada. Esta série de diluições foi feita para se obter contagens de 30-300 bactérias viáveis nas placas. Em cada passo da diluição usou-se uma pipeta limpa e esterilizada de um ml. O plaqueamento foi feito tomando - se 0,1 ml de cada diluição o qual foi colocado no fundo de uma placa de petri esterilizada. A amostra foi então coberta com aproximadamente 15 ml de meio de levedura liquefeito e resfriado para 48°C. As placas sofreram ligeira agitação para que as bactérias pudessem ficar bem dispersas no meio, facilitando a posterior contagem de colônias. Quando o ágar se solidificou, as placas foram invertidas e incubadas a 28°C por sete dias, quando foi feita a contagem de colônias. O valor obtido na contagem das colônias foi multiplicado pelo fator de diluição e, para melhor avaliação, foram convertidas para logarítmos na base 10.

4.5.5. Coleta de dados

Com exceção do experimento IV foram analisados os parâmetros:

4.5.5.1. Peso seco da planta e peso seco dos nódulos.

Após a colheita as plantas foram postas a secar em estufa com ventilação a 60°C, pesadas e moídas para posterior determinação do nitrogênio.

Os nódulos foram retirados das plantas, postos para secar em estufa a 60°C e pesados.

4.5.5.2. Determinação do Nitrogênio

A análise química quantitativa para determinação do nitrogênio foi feita no Departamento de Solos e Nutrição de plantas, pelo método Semi-Microkjeldahl, de acordo com SARRUGE e HAAG (1974). Os dados obtidos nesta análise foram multiplicados pelo peso da planta obtendo-se desta forma o nitrogênio total da planta.

4.5.5.3. Determinação da atividade da nitrogenase.

As análises da redução de acetileno foram feitas em cromatógrafos a gás VARIAN com detector de ionização de chama de H₂ a 130°C.

Durante a colheita, pedaços de raízes com nódulos foram colocados em frascos de vidro, com capacidade para 19 ml e vedados com rolhas de borracha.

Os nódulos contidos nestes frascos foram incubados por uma hora a uma atmosfera de acetileno. Decorrido este período, e através do uso de uma seringa plástica, tomou-se de cada frasco alíquotas de 0,5 ml que foram analisadas em colunas de Porapak N à temperatura de 110°C. O gás carregador foi o N₂ a um fluxo de 5 cm³/10".

A medida da redução do acetileno foi determinada pela fórmula:

$$\frac{LVK}{P.T.I.} = \mu \text{ moles } C_2H_4/\text{hora.g de nódulo seco.}$$

sendo:

L = pico da amostra = Altura (cm) X Atenuação no aparelho.

V = volume do frasco (ml).

K = quantidade de etileno que dá um pico de 1 cm de altura.

P = peso seco dos nódulos incubados.

T = tempo de incubação.

I = Volume do gás injetado.

O valor K é obtido a partir da leitura cromatográfica de um volume padrão de etileno injetado. O padrão utilizado continha 500 vpm de C₂H₄, e portanto cada 0,5 ml continha 0,25X10⁻³ ml de C₂H₄ puro. Nas CNTP tem-se:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \text{ ————— } 22,400 \text{ ml} \\ x \text{ ————— } 0,25 \times 10^{-3} \text{ ml} \end{array}$$

$$X = 11,16 \text{ } \mu\text{moles/amostra de } 0,5 \text{ ml.}$$

$$\begin{array}{l} 11,16 \text{ } \mu\text{moles} \text{ ————— } \text{altura do pico (cm)} \\ \text{K} \text{ ————— } 1 \text{ cm} \end{array}$$

Este método baseia-se no fato de que a nitrogenase atua também sobre outros substratos, com o gás acetileno, reduzindo-o a etileno.

4.5.6. Análise dos Dados

Foi feito o tratamento estatístico dos dados, através da análise da variância em blocos ao acaso. De acordo com os níveis de significância obtidos pelo teste F, procedeu-se à análise das médias dos tratamentos, pelo teste Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I : Efeito de diferentes doses de nitrogênio mineral, em Latossol, sobre a fixação simbiótica do nitrogênio, em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

5.1.1. Peso Seco da parte aérea das plantas.

Os valores obtidos pelos teste F, dos dados de peso seco da parte aérea das plantas, encontram-se relacionados na Tabela 5. O coeficiente de variação do experimento foi de 9,8%. Pelo teste F observou-se diferença significativa, ao nível de 1% entre doses, sendo que a análise não detectou diferença entre estirpes. Aplicou-se o teste Tukey para todos os tratamentos, ao nível de 5% de significância e as diferenças mínimas significativas (DMS), além das médias dos diferentes parâmetros analisados, podem ser vistas na Tabela 6.

5.1.2. Porcentagem de Nitrogênio na parte aérea das plantas

Os resultados são apresentados na Tabela 5. O experimento mostrou um coeficiente de variação de 8,9% e pelo teste F observou-se diferença significativa, ao nível de 1%, entre doses e, ao nível de 5%, entre estirpes, sendo que a análise não detectou interação significativa. Na Tabela 6 são apresentadas as médias com as respectivas diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey.

5.1.3. Nitrogênio total da parte aérea

A partir dos dados de peso seco da parte aérea e da porcentagem de nitrogênio da parte aérea das plantas, calculou-se o valor de nitrogênio total. Os resultados podem ser vistos na Tabela 5. A análise da variância mostrou diferenças significativas, ao nível de 1% para doses de nitrogênio e estirpes, não sendo detectadas interações significativas entre elas. O coeficiente de variação foi de 10,2%. A comparação das médias deste parâmetro, feitas pelo teste Tukey, assim como as diferenças mínimas significativas estão apresentadas na Tabela 6.

5.1.4. Peso seco dos nódulos

Os valores obtidos pelo teste F são mostrados na Tabela 5. Este teste evidenciou diferença significativa, ao nível de 1%, entre doses mas não detectou diferenças entre estirpes. O coeficiente de variação foi de 48,7%. As diferenças mínimas significativas (DMS), pelo teste Tukey, ao nível de 5%, estão apresentadas na Tabela 6.

5.1.5. Acetileno Reduzido

Estão apresentados na Tabela 6 as médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), pelo teste Tukey (5%).

O teste F evidenciou diferença significativa ao nível de 1% entre doses mas não detectou diferença entre estirpes e o coeficiente de variação foi de 51,4%. Estes dados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Experimento I : Valores obtidos pelo teste F, da análise de variância dos dados de Nitrogênio Total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C₂H₂ reduzido/h.g de tecido nodular.

FONTE DE VARIÇÃO	GI	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA PARTE AÉREA	PESO SECO DOS NÓDULOS	C ₂ H ₂ REDUZIDO
tratamento	15	5,692**	5,401**	2,513**	13,115**	14,798**
Dose de N	4	18,046**	15,545**	3,115**	47,861**	3,590**
Estirpe	2	3,590**	2,431**	0,401	1,254	0,632
D vs E	8	0,756	1,703	1,836	0,369	1,610
C.V. (%)		10,2	8,9	9,8	48,7	51,4

** nível de 1% de probabilidade.

Tabela 6 - Experimento I : Médias de Nitrogênio Total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco dos nódulos (g) e C_2H_2 reduzido/h.g de tecido nodular (μM). Médias comparadas pelos teste Tukey.

S/inoc.	TRATAMENTOS INÓCULOS N(ppm)	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA PARTE AÉREA	PESO SECO DOS NÓDU- LOS	C_2H_2 REDUZIDO
	15	6,129 cd	2,684 abcd	2,455 ab	0,135 a	2,413 d
	0	6,578 abcd	2,359 bcde	2,822 ab	0,045 c	213,678 ab
	10	6,642 abcd	2,303 cde	3,067 a	0,040 c	67,006 bcd
	20	7,066 abcd	2,892 ab	2,767 ab	0,022 c	11,535 d
	30	7,954 ab	2,156 dc	2,735 ab	0,137 a	139,558 bc
	0	5,932 d	2,122 e	2,750 ab	0,047 c	268,019 a
	10	5,829 d	2,471 abcd	2,507 ab	0,020 c	92,193 bcd
	20	6,202 cd	2,926 a	2,825 ab	0,017 c	40,175 bcd
	30	8,167 a	2,373 bcde	2,600 ab	0,145 a	10,247 d
	0	5,650 d	2,177 de	2,597 ab	0,062 b	143,774 bc
	10	5,660 d	2,205 de	2,957 ab	0,055 c	23,058 d
	20	6,468 bcd	2,761 abc	2,825 ab	0,020 c	300,616 a
	30	7,776 abc	0,551	0,674	0,064	115,740
	D.M.S. (5%)	1,695	0,551	0,674	0,064	115,740

OBS:- Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

5.2. Experimento II : Efeito de diferentes doses de nitrogênio mineral, em areia de rio lavada, sobre a fixação simbiótica do nitrogênio em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

5.2.1. Peso Seco da parte aérea das plantas

Os valores obtidos pelo teste F, dos dados da parte aérea das plantas se encontram na Tabela 7. Observou-se diferença significativa, ao nível de 1% entre doses, não sendo detectada diferença entre estirpes. O coeficiente de variação foi de 18,9%. Na Tabela 8 estão relacionadas as mêdias do peso seco da parte aérea e também as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey.

5.2.2. Porcentagem de Nitrogênio na parte aérea das plantas

Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Observou-se diferença significativa, ao nível de 1%, entre doses e estirpes, mas não se detectou interação. O coeficiente de variação foi de 13,2%. As mêdias e as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey encontram-se na Tabela 8.

5.2.3. Nitrogênio total da parte aérea

A partir dos dados de peso seco da parte aérea e da porcentagem de nitrogênio, calculou-se o valor do nitrogênio total. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 7. O coeficiente de variação foi de 21,6% e a análise detectou, pelo teste F, diferenças significativas, ao nível de 1%, entre doses e estirpes mas não foi detectada interação entre ambas. As médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey podem ser vistas na Tabela 8.

5.2.4. Peso Seco dos Nódulos

O teste F evidenciou diferença significativa, ao nível de 1%, entre doses mas a análise não detectou diferença entre estirpes. Estes dados e o coeficiente de variação que foi de 51,9% podem ser observados na Tabela 7. As médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), pelo teste Tukey podem ser observadas na Tabela 8.

5.2.5. Acetileno Reduzido

Estão apresentados na Tabela 8 as médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), pelo teste Tukey.

O teste F evidenciou diferença significativa entre doses mas não detectou diferenças entre estirpes. O coeficiente de variação foi de 72,8%. Estes dados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Experimento II : Valores obtidos pelo teste F, da análise de variância dos dados de Nitrogênio total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de Nódulos e C₂H₂ reduzido/h.g de tecido nodular.

FONTE DE VARIACÃO	GL	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA PARTE AÉREA	PESO SECO DOS NÓDULOS	C ₂ H ₂ REDUZIDO
Tratamento	15	8,719**	10,211**	3,192**	10,182**	2,573**
Dose de N	4	29,107**	33,064**	10,170**	36,745**	3,456**
Estirpe	2	3,827**	3,867**	0,264	1,322	0,230
D vs E	8	0,839	1,646	0,834	0,038	0,568
C.V. (%)		21,6	13,2	18,9	51,9	72,8

** nível de 1% de probabilidade.

Tabela 8 - Experimento II : Médias de Nitrogênio Total (g), Porcentagem de Nitrogênio ,
 Peso seco da parte aérea (g), Peso seco dos nódulos (g) e C₂H₂reduzido/h.g de
 tecido nodular (µM). Médias comparadas pelo teste Tukey.

TRATAMENTOS	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA PARTE AÉREA	PESO SECO DOS NÓDULOS	C ₂ H ₂ REDUZIDO	
INÓCULOS N(ppm)						
S/inoc.	15	4,755 bc	3,125 bc	1,520 ab	0,012 c	1,261 c
	0	3,051 c	2,324 c	1,325 b	0,092 a	36,883 c
	20	3,915 c	2,793 c	1,450 ab	0,035 c	260,556 a
CO5	40	5,720 bc	2,795 bc	1,967 ab	0,020 c	137,439 bc
	60	7,453 ab	3,864 ab	2,142 a	0,018 c	8,980 c
	0	3,382 c	2,744 c	1,237 b	0,095 a	54,798 c
	20	4,364 c	2,166 c	1,827 ab	0,039 bc	229,075 ab
CO9	40	5,194 bc	2,660 c	1,980 ab	0,021 c	298,900 a
	60	7,490 ab	4,242 a	1.837 ab	0,030 c	50,644 c
	0	3,602 c	2,716 c	1,325 b	0,082 ab	146,354 bc
	20	5,616 bc	2,908 bc	1,940 ab	0,035 c	243,347 ab
CL3	40	5,904 bc	3,132 bc	1,907 ab	0,019 c	47,214 c
	60	9,501 a	4,693 a	2,032 ab	0,003 c	61,799 c
D.M.S. (5%)		2,905	1,045	0,818	0,046	141,670

OBS:- Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

5.3. Experimento III : Influência de diferentes níveis de calagem do solo na fixação simbiótica do nitrogênio em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*

5.3.1. Peso seco da parte aérea das plantas

Os valores obtidos, pelo teste F, dos dados de peso seco da parte aérea das plantas encontram-se na Tabela 9. Observou-se diferença significativa, ao nível de 1% entre doses e estirpes. O coeficiente de variação foi de 11,8%. Na Tabela 10 estão apresentadas as médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey.

5.3.2. Porcentagem de Nitrogênio na parte aérea das plantas

Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Observou-se diferença significativa, ao nível de 1%, entre doses e estirpes, mas o teste F não detectou interação entre elas. O coeficiente de variação foi de 16,0%. As médias

e as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey encontram-se na Tabela 10.

5.3.3. Nitrogênio total da parte aérea

A partir dos dados de peso seco da parte aérea e da porcentagem de nitrogênio, calcularam-se os dados de nitrogênio total. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 9. O coeficiente de variação foi de 16,8% e o teste F mostrou diferenças significativas, ao nível de 1%, para doses e ao nível de 5%, para estirpes, mas não detectou interação entre ambas. As médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), ao nível de 5%, pelo teste Tukey, podem ser vistas na Tabela 10.

5.3.4. Peso seco dos nódulos

O teste F evidenciou diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, para doses mas ele não detectou diferença entre estirpes. O coeficiente de variação foi de 15,8%. Estes dados podem ser observados na Tabela 9. As médias e as diferenças mínimas significativas (DMS)

pelo teste Tukey, podem ser observadas na Tabela 10.

5.3.5. Acetileno Reduzido

Estão apresentadas na Tabela 10 as médias e as diferenças mínimas significativas (DMS), pelo teste Tukey.

O teste F, evidenciou diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, entre doses, não sendo detectada diferença entre estirpes. O coeficiente de variação foi de 153,1%. Estes dados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Experimento III : Valores obtidos pelo teste F, da análise de variância dos dados de Nitrogênio Total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C_2H_2 reduzido/h.g de tecido nodular.

FONTE DE VARIÇÃO	GL	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA PARTE AÉREA	PESO SECO DOS NÓDULOS	C_2H_2 REDUZIDO
Tratamento	11	12,416**	17,905**	56,633**	66,600**	2,104*
Nível de Calagem	3	42,317**	56,575**	199,530**	243,400**	2,175**
Estirpe	2	2,126*	2,385*	4,723**	0,200	0,693
E vs C	6	0,896	3,743*	0,655	0,400	1,040
C.V. (%)		16,8	16,0	11,8	15,8	153,1

* nível de 5% de probabilidade.

** nível de 1% de probabilidade.

Tabela 10 - Experimento III : Médias de Nitrogênio Total (g), Porcentagem de Nitrogênio, Peso seco da parte aérea (g), Peso seco de nódulos (g) e C₂H₂ reduzido/h.g. de tecido nodular (µM). Médias comparadas pelo teste Tukey.

TRATAMENTOS INÓCULOS pH	N TOTAL	% DE N	PESO SECO DA		PESO SECO DE		C ₂ H ₂ REDUZIDO
			PARTE AÉREA	NÓDULOS	NÓDULOS	REDUZIDO	
C05	4,5	4,504 b	0,897 cd	0,002 e	8,569 c		
	5,5	3,311 b	1,519 b	0,041 cd	24,457 c		
	6,5	3,123 b	2,513 a	0,059 b	55,699 c		
	7,5	3,402 b	2,614 a	0,077 a	83,365 bc		
C09	4,5	6,261 a	0,657 d	0,002 e	0,000		
	5,5	3,318 b	1,206 bc	0,040 cd	25,836 c		
	6,5	2,884 c	2,545 a	0,058 b	60,596 bc		
	7,5	3,143 b	2,287 a	0,079 a	207,492 a		
C13	4,5	6,384 a	0,701 d	0,005 e	0,000 c		
	5,5	3,540 b	1,326 bc	0,035 d	132,803 ab		
	6,5	2,898 c	2,436 a	0,056 bc	78,346 bc		
	7,5	3,262 b	2,377 a	0,078 a	151,802 ab		
D.M.S. (5%)	2,479	1,497	0,509	0,017	86,80		

OBS:- Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

5.4. Experimento IV : Influência de diferentes níveis de pH do meio de cultura no crescimento de três estirpes de *Rhizobium phaseoli* "in vitro".

Foi contado o número de bactérias de cada estirpe, através do cultivo em meio de cultura, a três níveis de pH. A contagem foi feita por diluição e plaqueamento. Os valores médios obtidos podem ser observados na Tabela 11. Não se procedeu à análise estatística destes resultados, pois os valores obtidos evidenciaram o maior crescimento de bactérias quando cultivadas sob valores de pH 6,5.

Tabela 11 - Experimento IV : Número médio de talos bacterianos/ml de meio de cultura, para as estirpes estudadas.

VALOR DE pH DO MEIO	NÚMERO MÉDIO DE COLÔNIAS		
	C05	C09	C13
4,5	zero	zero	zero
5,5	$2,6 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$
6,5	$2,7 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^9$

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento I : Efeito de diferentes doses de nitrogênio mineral, em Latossol, sobre a fixação simbiótica do nitrogênio, em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Neste experimento foram empregadas pequenas doses parceladas de nitrogênio mineral, no plantio e 20 dias após o plantio. Estas doses foram de zero, 10, 15, 20 e 30 ppm de nitrogênio e seus efeitos sobre a fixação de nitrogênio, na presença das estirpes C05, C09 e C13, foram mostradas nas Tabelas 5 e 6.

Comparando-se as médias de peso seco da parte aérea para as diferentes doses empregadas, verificou-se que melhor resposta foi obtida quando se usou 20 ppm de nitrogênio mineral, na presença da estirpe C05. A presença de nitrogênio no solo praticamente não afetou o desenvolvimento vegetativo da planta pois as diferenças entre as médias dos tratamentos que receberam nitrogênio não diferiram estatística

mente do tratamento não adubado. As pequenas variações entre elas talvez possam ser atribuídas às diferenças entre as es tirpes, já que, todas as médias diferiram da testemunha não inoculada. Os resultados desta análise indicam que o nitrogê nio mineral teve pouca influência no desenvolvimento vegetativo, com exceção no caso abordado acima, ou seja, dose de 20 ppm de nitrogênio quando na presença de estirpe C05.

A testemunha não inoculada, que recebeu 15 ppm de nitrogênio nos mostrou que, embora não detectado estatisticamente pelo teste F, a inoculação teve um efeito posi tivo sob a produção na parte aérea das plantas, já que foi a menor média observada e que diferiu estatisticamente das demais.

Em relação à porcentagem de nitrogênio, os tratamentos que receberam maior dose de nitrogênio superaram os demais. Dentre estes a dose de 30 ppm em presença da es tirpe C09 foi a melhor, vindo em seguida esta mesma dose em presença da estirpe C05 e finalmente a C13. No entanto, a es tirpe C09, combinada com pequenas doses de nitrogênio, foi a que apresentou menores concentrações de nitrogênio foliar, sendo mesmo inferior à testemunha não inoculada. Isso em par te pode ser explicado pelo fato de que estes tratamentos a pon taram bom desenvolvimento vegetativo e é comum haver me nor concentração de elementos em plantas de maior porte.

Os resultados para nitrogênio total da parte aérea da planta são os que melhor refletem a capacidade produtiva da planta, isto é, pode-se considerar que existe uma correlação estreita entre o conteúdo total de nitrogênio de uma planta e a grandeza da colheita (LEITE, 1977). Neste caso, observou-se que os dados estão de acordo com os analisados para porcentagem de nitrogênio visto que o inoculante CO9 na ausência de nitrogênio ou em presença de 10 ppm deste elemento apresentou menor valor de nitrogênio total. Para esta estirpe o nitrogênio no solo na concentração de 30 ppm foi de maior efeito com uma média superior e que inclusive sobrepujou significativamente as demais. Mas mesmo para os outros dois inoculantes, esta dosagem, apresentou melhores resultados, seguida da concentração de 20 ppm. Como houve maior quantidade de nitrogênio total nas plantas que receberam nitrogênio mineral quando comparadas com aquelas que não receberam esse elemento, pode-se inferir que o nitrogênio fixado simbioticamente não foi adequado para aumentar o teor de nitrogênio da planta à níveis semelhantes aos fornecidos pela adubação nitrogenada. Estas observações estão de acordo com os resultados apresentados por RUSCHEL e REUSZER, 1973.

Quanto à massa nodular, pode-se verificar pelas médias dos tratamentos, que a adição de nitrogênio influiu negativamente na produção de nódulos. As maiores mé

dias foram as dos tratamentos que não receberam nitrogênio , não havendo diferença significativa entre as médias dos outros tratamentos. Estas observações indicam uma tendência de maior nodulação na ausência deste elemento. A presença de poucos nódulos no tratamento sem inoculação indicam uma possível contaminação pela água de irrigação.

Em relação ao acetileno reduzido, as melhores médias observadas, para todos os inoculantes foram as relativas aos tratamentos que receberam 10 ppm de nitrogênio. As diferenças observadas entre estas médias foi devido, naturalmente, às diferentes respostas das três estirpes em relação ao nitrogênio. Entretanto, notou-se certa descontinuidade , principalmente no que se refere à estirpe Cl3 em presença de 30 ppm de nitrogênio, já que foi a maior média observada. Estas discrepâncias podem ser atribuídas à aplicação do próprio método. Este, de acordo com os dados da literatura, é um método adequado e de bons resultados, mas certos controles na sua execução podem escapar ao experimentador sendo fonte de erro e variação. O alto valor observado no coeficiente de variação para a redução de acetileno reflete a existência de erros experimentais na aplicação do método.

6.2. Experimento II : Efeitos de diferentes doses de nitrogênio mineral, em areia de rio lavada, sobre a fixação simbiótica do nitrogênio, em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Empregaram-se, nesse experimento, doses de nitrogênio mineral nas concentrações de zero, 15, 20, 40 e 60 ppm. Estas doses foram aplicadas parceladamente no plantio e 20 dias após o plantio na presença das estirpes C05, C09 e C13. Os dados obtidos foram mostrados nas Tabelas 7 e 8.

Estudando as médias de peso seco da parte aérea para as diferentes doses empregadas, verificou-se que as melhores respostas foram observadas nos tratamentos com nitrogênio na concentração de 60 ppm na presença das estirpes C05 e C13 respectivamente. As menores médias foram as dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada, diferindo significativamente das médias superiores e das médias intermediárias. Destas faz parte também a média do tratamento que não recebeu inoculação. Estes resultados podem ser atribuídos a dois fatores: o substrato utilizado e a inoculação. Isto porque a maioria das médias foram de valores intermediários indicando a necessidade do nitrogênio mineral para o desenvolvimento vegetativo, já que o substrato, neste caso areia, não possui traços deste elemento para suprir as exi-gências iniciais para o crescimento da planta. Concomitante-mente há o papel da inoculação, na obtenção de bons resulta-dos, porque ela sozinha não foi capaz de suprir a necessida-de da planta com nitrogênio fixado simbioticamente. Depreen-de-se assim que para boa produção de material vegetativo no

feijão, frente às estirpes estudadas, faz-se necessário a aplicação também de adubos nitrogenados que supram, em parte, as exigências do vegetal.

Na análise da porcentagem de nitrogênio os tratamentos que receberam maior concentração de nitrogênio superaram significativamente os demais e desta vez, pode-se observar diferenças no desempenho dos inoculantes. Assim as estirpes C09 e C13 superaram a C05. Estas diferenças podem ser observadas também em relação aos outros tratamentos. O que ficou evidente no entanto, foi o teor de nitrogênio nas plantas não inoculadas. A média neste caso foi superior, inclusive, a alguns tratamentos inoculados mostrando uma possível interferência do nitrogênio no processo de fixação simbiótica.

Como já foi citado anteriormente, os dados de nitrogênio total são os que refletem melhor a capacidade produtiva da planta. Neste caso a média superior observada foi na interação entre o inoculante C13 e a dose de 60 ppm, de N. Depois desta seguiram-se as médias dos inoculantes C09 e C05, para a mesma dose. Estes resultados repetem em parte, os observados nos dados de peso seco da parte aérea. O tratamento que não recebeu inoculação foi significativamente maior que as médias dos tratamentos inoculados e com doses menores de nitrogênio, não foi superior contudo às doses de 40 e 60

ppm. Como o efeito das estirpes foi significativo, e a adição de nitrogênio no solo foi um fator de decisiva influência, as diferenças observadas entre os tratamentos inoculados, dentro de cada dose, podem ser atribuídos às diferenças na capacidade de simbiose de cada estirpe.

Entretanto, neste experimento, mais uma vez fica evidenciado que a adição de nitrogênio não favorece a nodulação já que as melhores médias foram as dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada, diferindo significativamente das demais. Aliás MUNNS (1968) demonstrou que quando o nitrato é fornecido na inoculação o número de raízes infectadas fica muito reduzido. TANNER e ANDERSON (1963) sugerem que o nitrato interfere na formação do ácido indol-acético prejudicando o processo de nodulação.

O valor da aplicação de nitrogênio em leguminosas tem sido discutido, já que esse elemento pode ser fornecido, em parte, pela fixação simbiótica.

HAMOND *et alii*, no estudo de absorção de nutrientes pela soja, referindo-se a trabalhos desenvolvidos por outros autores, assinalaram a possibilidade do nitrogênio fixado ser inadequado à necessidade nutricional dessa cultura, e constataram sintomas indicativos da deficiência de nitrogênio no período de intensa síntese clorofiliana, isto é, quando do rápido desenvolvimento da planta (citado por GALLO e MIYASAKA, 1961).

Os dados obtidos por GALLO e MIYASAKA (1961), em feijão mostraram que a maior demanda da planta em nitrogênio ocorre no período crítico de crescimento da semente, o que se assemelhou aos resultados apresentados por HAMOND para soja. Os dados sugeriram que uma aplicação tardia de nitrogênio no feijoeiro seria desejável, desde que as necessidades da planta não estejam satisfeitas pelo nitrogênio do solo ou proveniente da fixação. Afirmam ainda, que esta aplicação tardia não interferiria com a etapa inicial do processo simbiótico da fixação de nitrogênio pelas bactérias.

MIYASAKA e MASCARANHAS (1963), mostraram que a adubação nitrogenada no feijoeiro aplicada cinco a dez dias após a germinação, tem aumentado com frequência a produção.

Em experimentos que tiveram areia como substrato, observaram-se que há um período inicial de desenvolvimento seriamente prejudicado pela falta de nitrogênio, porque a reserva da semente se esgotou, sempre antes do início da fixação simbiótica. Tendo por base este problema GUSS e DÖBEREINER (1972) aplicaram doses moderadas de nitrogênio mineral no plantio e 20 dias após o plantio, época em que, supostamente se esgotaria a reserva da semente. Observaram que houve aumento de nodulação e este fato foi explicado pelo desenvolvimento normal da planta até a iniciação dos nódulos proporcionado pela reserva da semente, juntamente com o nitrogênio mineral fornecido no plantio. Quando após 20 dias

as plantas receberam outra dose de nitrogênio, a reserva da semente havia suprido as necessidades até então. Por isso, nem o nitrogênio da areia na germinação, e nem o aplicado 20 dias após prejudicou a iniciação dos nódulos e seu desenvolvimento.

De um modo geral nos experimentos realizados neste trabalho, notou-se que as maiores doses de nitrogênio foram as que deram melhores respostas, no que se refere ao nitrogênio total. Entretanto, em condições diferentes, onde se tivessem estirpes mais eficientes, doses menores poderiam ter apresentado resultados positivos sendo por isso recomendado, para cada caso, seleção prévia de estirpes de acordo com os objetivos a serem alcançados.

Contudo, estes dados assim como os da literatura demonstram claramente a complexidade do balanço entre a aplicação do nitrogênio mineral e a fixação do nitrogênio.

Quanto à redução do acetileno o que se notou nos experimentos efetuados nesse trabalho, foi que a massa nodular não refletiu necessariamente a atividade da nitrificação, isto porque existiram casos em que apesar da massa nodular ser alta o acetileno reduzido foi baixo, sendo que o inverso também ocorreu, embora estas diferenças foram observadas com diferentes estirpes. Isto quer dizer que nem sempre maior peso nodular seja índice de maior atividade enzimática, sendo esta dependente da estirpe em estudo e de con

dições controladas durante o ensaio, entre outros fatores.

No ensaio em que o substrato empregado foi areia, as melhores respostas para o acetileno foram nas doses de 10 e 20 ppm para as estirpes C05 e C09 e de 0 e 10 para a estirpe C13. Entretanto nestes casos a massa nodular não foi grande sugerindo que apesar da nodulação ter sido prejudicada pela adição de nitrogênio mineral a atividade enzimática não o foi. Como pode ser observado nas Tabelas apresentadas, existem casos em que, apesar do teor de nitrogênio total ser elevado, não ocorre correspondência na quantidade de acetileno reduzido.

RUSCHEL e RUSCHEL (1975) atribuem os valores de etileno baixos, relacionados com valores de nitrogênio total altos, à perda de parte da atividade da nitrogenase devido ao manuseio das amostras. Esta explicação talvez possa ser aplicada neste experimento para algumas amostras.

Este fato, mais as possíveis fontes de erro, lembradas anteriormente, puderam ter contribuído para as variações observadas entre os resultados de etileno produzido.

Além disto, BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977) observaram que as medidas de produção de etileno a partir de acetileno pelos nódulos fornecem um método para medir aproximadamente o fluxo de eletrons gerado pela nitrogenase. Observações recentes, entretanto, mostram que esta técnica não é uma representação verdadeira da redução de N_2 devido aos ní-

veis significantes de H_2 evoluídos pela nitrogenase. Por isso torna-se necessário, para se ter medidas exatas, determinar a redução de C_2H_2 e a evolução de H_2 pelos nódulos.

Segundo HARDY *et alii* (1968), a razão entre acetileno reduzido e N_2 fixado é de 3:1 e portanto obtem-se a quantidade de N_2 fixado dividindo-se o valor de acetileno por três. Porém, BERKUM (1978), ressalva que C_2H_2 é mais solúvel em água do que N_2 e que por isso a conversão teórica do fator três não deve ser aplicada e a proporção adequada pode ser encontrada usando-se os métodos de N^{15} ou Kjeldahl.

SAITO (1978) em estudos feitos em feijoeiros encontrou valores que variaram de 1,32 a 1,43 para a relação $C_2H_4/(3N_2+H_2)$. Pelo fato desta relação ser alta considerou que a medida indireta da redução de C_2H_2 superestimou a fixação real de nitrogênio já que a evolução de H_2 foi incluida nas determinações.

De qualquer maneira, a técnica de redução do acetileno deve ser considerada como suplementar, não substittuindo as medidas usuais, tais como o teor de nitrogênio total e o peso seco das plantas.

6.3. Experimento III: Influência de diferentes níveis de calagem do solo na fixação simbiótica do Nitrogênio em feijão, com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Usando-se o solo Regossol "série Ribeirão Claro", de pH igual a 4,5, fez-se um estudo em feijão com as estirpes C05, C09 e C13 no solo com valores de pH 4,5, 5,5, 6,5 e 7,5. Os resultados obtidos neste experimento se encon

tram nas Tabelas 9 e 10.

Analisando-se os dados de peso seco da parte aérea das plantas observou-se que as médias das plantas desenvolvidas nos valores de pH iguais a 6,5 e 7,5 foram superiores e diferiram estatisticamente das outras. A análise estatística detectou influência dos inoculantes mas não se pode apontar uma estirpe que tenha sido superior às demais, porque dentro dessa faixa de pH as médias se equivaleram. Porém, como não foi detectado interações entre estirpes e níveis de calagem, e como as médias das plantas desenvolvidas em solo com pH 4,5 foram significativamente inferiores, pode-se dizer que a calagem favoreceu significativamente a produção de matéria seca.

Como as plantas de pequeno porte apresentam maiores índices de nitrogênio foliar, os resultados da porcentagem de nitrogênio estão de acordo com o esperado. Assim as médias foram maiores no nível de pH 4,5, diferiram significativamente das médias dos outros tratamentos e estando em concordância com os resultados estudados na produção de matéria seca da parte aérea.

Os resultados para nitrogênio total refletiram os de peso seco da parte aérea. Deste modo as melhores respostas foram as das plantas em solo com valores de pH 6,5 e 7,5.

Houve também neste caso influência dos inocu

lantes e aqui pode-se destacar a estirpe C09 seguida da C05 e finalmente a C13. Todas no entanto, e de um modo geral, responderam favoravelmente à calagem do solo porque a níveis superiores de pH do solo resultaram eficientes.

A elevação do nível de pH favoreceu, entretanto, a massa nodular que foi muito inferior a pH 4,5 e 5,5. Este fato pode explicar talvez o pequeno desenvolvimento das plantas em solos ácidos dada sua incapacidade de formar nódulos nestas condições. Isto foi atribuído primeiramente à sensibilidade do *Rhizobium* à acidez em si, mas LIE (1969) , mostrou que a iniciação do nódulo é praticamente inibida em meio ácido. Todos estes dados contradizem os observados por DÖBEREINER (1966) que afirmou que plantas do feijoeiro mostraram abundante nodulação e fixação de nitrogênio em solo com pH 4,4.

Além do fato que a massa nodular foi afetada sob baixos níveis de pH, a atividade enzimática nestes nódulos se mostrou afetada.

DÖBEREINER (1966) observou grandes reduções na fixação de nitrogênio por grama de nódulo devido à toxidez de manganês em solos ácidos. Verificou também que essa toxidez pode atuar no crescimento bacteriano e conseqüentemente, no número de nódulos e no processo de fixação de nitrogênio dos nódulos, sendo ambos os efeitos dependentes da linhagem

de *Rhizobium*. A autora afirmou que as plantas aumentaram o número de nódulos com o aumento da calagem para pH superior a 5,5 com um aumento correspondente na produção de matéria seca. Este aumento na produção que ocorreu acima de pH 5,5 foi acompanhado por um decréscimo na porcentagem de N foliar quando comparada com as plantas em solo com pH 4,5.

Entretanto, em nosso experimento o que se observou foi que acima de pH 5,5 houve um acréscimo no Nitrogênio foliar assim como na produção de matéria seca.

Na realidade, todos os estudos efetuados mostram a influência do nível de pH do solo sobre a fixação simbiótica. Não há entretanto, dados suficientes sobre todos os aspectos dos efeitos da acidez e dos metais pesados sobre a associação *Rhizobium*-leguminosas.

Existem dados que mostram a possibilidade de que fatores no "complexo acidez", outros que a reação do solo em si, possam estar influenciando a ecologia do *Rhizobium*. HOLDING e LOWE (1971) afirmaram que a natureza, importân - cia ou ocorrência precisa destes fatores não estão claras. Discutiram a não existência de evidências que expliquem o desenvolvimento predominante de populações ineficientes nos solos ácidos ou que expliquem a ausência de respostas de algumas populações de *Rhizobium* à elevação do pH do solo. Para estes autores não há evidência de que a redução na eficiên - cia sob altos níveis de manganês e outros metais pesados o

corra no solo, mas sob condições ácidas, onde a toxicidade destes metais limita a produção, podem ocorrer alterações na eficiência.

Em nosso estudo provavelmente não houve problemas de toxidez de manganês porque o solo foi retirado de região alta, onde a presença deste elemento é de difícil ocorrência.

O que se nota é a escassez de dados conclusivos que nos deem idéia do que realmente ocorre nos solos ácidos. Torna-se necessária a elaboração de estudos adequados que nos deem idéia do papel da acidez do solo, assim como dos fatores decorrentes desta acidez, na ecologia do *Rhizo - bium*.

Estudos em cultura pura de *Rhizobium* nos mostram que o pH do meio é um fator decisivo no crescimento desta bactéria, contudo, deve-se ter precauções antes de se correlacionar as reações do meio no laboratório com a ecologia do *Rhizobium phaseoli* no solo e na rizosfera.

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram efetuados os experimentos e considerando-se que o nitrogênio total foi o parâmetro mais adequado para a avaliação, podemos concluir que o feijoeiro, para maior produção, deve também receber adubação nitrogenada (até pelo menos 30 ppm no solo), além da inoculação, já que só a inoculação não elevou o teor de nitrogênio da planta a níveis semelhantes aos fornecidos pela adubação nitrogenada.

As diferentes estirpes estudadas reagiram diferentemente em relação à adubação nitrogenada, sugerindo a necessidade de ensaios de seleção prévios, em relação à dosagem de nitrogênio mineral que será empregado.

Para as culturas de feijoeiro a calagem do solo tem efeito positivo no aumento da produção de matéria seca e nitrogênio total, sendo recomendada sua aplicação em solos ácidos, dados os problemas daí decorrentes para as

plantas e visto que as estirpes de *Rhizobium phaseoli* se mostram sensíveis aos valores baixos de pH do solo.

Finalmente pode-se afirmar que as modificações no solo, como calagem e introdução de fertilizante nitrogenado aumentam a eficiência das estirpes de *Rhizobium phaseoli*, no cultivar Carioca.

8. SUMMARY

Three green house studies were done for examining the influence of alterations in soil chemical composition such as changes in pH and the introduction of nitrogen fertilizer, and the influence that they could have on the symbiotic efficiency of strains C05, C09 and C13 of *Rhizobium phaseoli*, in the cultivar Carioca of beans (*Phaseolus vulgaris* L.).

In the first experiment with a Latosol, doses of 0, 10, 15, 20 and 30 ppm of NH_4NO_3 nitrogen were used. It was found that mineral nitrogen gave the best plant development at 30 ppm, in association with symbiotic nitrogen fixation.

In the second experiment river sand was used and the doses were 0, 15, 20, 40 and 60 ppm of the same nitrogen fertilizer. In this case the higher doses gave the best results and this was attributed to the absence of residual nitrogen in the sand. Generally the addition of mineral nitrogen favored the efficiency of strains studied.

A Regosol was used in the third experiment and

the initial pH was 4,5. This was raised to 5,5 , 6,5 and 7,5 by the addition of Ca(OH)_2 and this favored the efficiency of strains as well as raised the dry matter production and nitrogen content of the leaves.

In another experiment, "in vitro", the influence of the pH of culture media upon the strains was studied. The best response (about $2 \cdot 10^9$ cells/ml) was obtained in culture medium with pH near neutrality, less at pH 5,5 and no growth at pH 4,5, but would be improper to correlate these data with the activity in soil conditions where other complex factors may exercise their influence.

9. LITERATURA CITADA

- ALLOS, H.I. e W.V.BARTHOLOMEW, 1955. Effect of available nitrogen on symbiotic fixation. *Soil Science American Proceedings*, 19:182-184.
- ALLOS, H.I. e W.V. BARTHOLOMEW, 1959. Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen . *Soil Science*, 87:61-66.
- ALMEIDA, L.D., G.G.PESSANHA e A.F.PENTEADO, 1973. Efeito da calagem e da adubação fosfatada e nitrogenada na nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) . *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia*, 8:127-130.
- ASSUMPCÃO, R.M. e T.MORITA, 1968. *Manual de Soluções reagentes e solventes*. Edgard Blücher, Ed. USP. 607 pg.
- BANATH, C.L., E.A.N. GREENWOOD e J.F. LONERAGAN, 1966. Effect of calcium deficiency on symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiology*, 41:760-763.

- BERGERSEN, F.J., 1973. The use of ^{15}N in N_2 fixation experiments. Campinas, Instituto Agronômico do Estado, 39 pp. (mimeografado).
- BERKUM, van P., 1978. Gas-Liquid chromatography and the acetylene reduction assay. *Curso Intensivo sobre fixação do Nitrogênio nos trópicos*. Universidade Rural do Rio de Janeiro, 26 pp.
- BETHLENFALVAY, G.J. e D.A. PHILLIPS, 1977. Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. In : Hollaender A., ed. *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, 9:333-354.
- BRAUNER, J.L., R.A.CATANI e V.C. BITTENCOURT, 1966. Extração e determinação do Al trocável do solo. *Anais da ESALQ*, vol.23.
- BURRIS, R.H. e P.W. WILSON, 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. In : *Methods Enzymology*, 4:355-366.
- BURRIS, R.H., F.J.EPPLING, H.B.WAHLIN e P.W. WILSON, 1972. Studies of biological fixation with isotopic nitrogen. *Soil Science American Proceedings*, 7:258-262.
- BURTON, J.C., N.O.ALLEN e K.C. BERGER, 1961. Effects of certain mineral nutrients on growth and nitrogen fixation of inoculated bean plants, *Phaseolus vulgaris* L. *Agricultural and Food Chemistry*, 9:187-190.

- CARTWRIGHT, P.M., 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany*, 31:309-321.
- DELWICHE, C.C., 1970. The nitrogen cycle. In: Scientific American ed. *The Biosphere*. San Francisco, 137-146.
- DÖBEREINER, J., 1966. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. *Plant and Soil*, 24 : 153-166.
- DÖBEREINER, J., N.B.ARRUDA e A.F. PENTEADO, 1966. Problemas de inoculação de soja em solos ácidos. *Boletim do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul*, 6: 1153-1167.
- FLETT, R.J., J.W. RUDD e R.D. HAMILTON, 1975. Acetylene Reduction assays for nitrogen fixation in freshwaters: a note of caution. *Applied Microbiology*, 29:580-583.
- FRANCO, A.A. e J. DÖBEREINER, 1967. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - Feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia*, 2:467-474.
- FRANCO, A.A. e J. DÖBEREINER, 1968. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. *Pesquisa Agropecuária*

Brasileira, Série Agronomia, 3:223-227.

GALLO, J.R. e S. MIYASAKA, 1961. Composição química do feijoeiro e absorção de elementos nutritivos do florescimento à maturação. *Bragantia, 40 :867-884.*

GIBSON, A.H., 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. *Australian Journal of Biological Sciences, 16:28-42.*

GIBSON, A.H. e P.S. NUTMAN, 1960. Studies on the physiology of nodule formation. VII. A reappraisal of the effect of preplanting. *Annals of Botany, 24:420-433.*

GOEFFERT, C.F. e J.R.J.FREIRE, 1973. Influência da aeração do solo e da calagem sobre o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em três solos ácidos do Rio Grande do Sul. *Agronomia Sulrio-grandense, Porto Alegre , IX(2):143-149.*

GUSS, A. e J. DÖBEREINER, 1972. Efeito da adubação nitrogenada e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris*) . *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, 7:87-92.*

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

- HAUCK, R.D., 1971. Quantitative estimates of nitrogen cycle processes. In: IAEA, ed. *Nitrogen 15 in soil-plant studies*. Sofia, Proc. of the FAD/IAEA. The technical meeting.
- HOLDING, A.J. e J.F. LOWE, 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium*-Leguminous plant association. *Plant and soil, Special Volume*; 153-166.
- HOYT, P.B. e R.C. TURNER, 1975. Effect of organic material added to very acid soils on pH. Aluminium exchangeable, NH_4 and crop yield. *Soil Science*, 119:3-6.
- KOCH, B.L. e H.J. EVANS, 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean nodules. *Plant Physiology*, 41:1748-1750.
- LEITE, L.C., 1977. Efeito de fungicidas sistêmicos sobre a nodulação e fixação de nitrogênio em soja (*Glycine max*(L.) Merrill). Piracicaba, ESALQ/USP. 53p. (Tese de Mestrado).
- LIE, T.A., 1969. The effect of low pH on different phases of nodule formation in pea plants. *Plant and Soil*, 31:391-406.
- LIE, T.A., 1971. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant and Soil, Special Volume*, 117-127.
- LIE, T.A., 1974. Environmental effects on nodulation and

- symbiotic nitrogen fixation. In: A. Neuberger and E.L. Tatum, ed. Publ. North Holland Publishing Company. *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam and Oxford.
- MEDINA, J.C. e S. MIYASAKA, 1972. Zoneamento ecológico para o feijoeiro. In: *Anais do I Simpósio Brasileiro de Feijão*. Campinas, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária. pp. 129-142.
- MIYASAKA, S. e H.A.A, MASCARANHAS, 1963. Modo e época de aplicação de nitrogênio na cultura do feijoeiro. *Bragantia*, 22: 511-519.
- MUNNS, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. *Plant and Soil*, 28:129-146.
- MUNNS, D.N., R.L. FOX e B.L. KOCH, 1977. Influence of lime on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. *Plant and Soil*, 46:591-601.
- NORRIS, D.O., 1959. The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. *Australian Journal Agriculture Research*, 10:651-698.
- NORRIS, D.O., 1964. Technique used in work with *Rhizobium*. In: "Some Concepts and Methods in Subtropical Pasture Research". Bulletin 47, Commonwealth Agricultural Bureaux, England. p. 186-198.

- NUTMAN, P.S., 1956. The influence on the legume in root-nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. *Biology Review*, 31:109-149.
- PATE, J.S., 1961. Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. *Nature*, 192:637-639.
- PATE, J.S. e P.S. DART, 1961. Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strain and time of application on ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil*, 15:329-346.
- PRATT, P.F., 1961. Effect of pH on the cation - exchange capacity of surface soil . *Soil Science American Proceedings*, 25: 96-98.
- PRATT, P.F., 1966. Química do solo. Convênio M.A./DPFS. USAID/Brasil. (Mimeografado 88 pp.).
- QUISPEL, A., 1974. General introduction. In: Quispel, A., ed. *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., 769 p.
- RAGGIO, M., N. RAGGIO e J.G. TORREY, 1965. The interaction of nitrate and carbohydrates in rhizobial root nodule formation. *Plant Physiology*, 40:601-606.
- RICE, W.A., 1975. Effects of CaCO₃ and inoculum level on

- nodulation and growth of Alfafa in an acid soil. *Canadian Journal of Soil Science*, 55 :245-250.
- RUSCHEL, A.P., R. ALVAHYDO e A.F. PENTEADO, 1962. Influência do cálcio, do magnésio e da acidez sobre o *Rhizobium phaseoli* em meio de cultura. *Comunicado Técnico 16*, Inst. Ecol.Exp. Agrícolas, Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.
- RUSCHEL, A.P., D.P.S. BRITTO e J. DÖBEREINER, 1966. Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).II. Influência do magnésio do boro, do molibolênio e da calagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia*, 1:141-145.
- RUSCHEL, A.P. e H.W. REUSZER, 1973. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium - Phaseolus vulgaris*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia*, 8:287-292.
- RUSCHEL, A.P. e R. RUSCHEL, 1975. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia*, 10:11-17.
- RUSSEL, E.J., 1950. *Soil conditions and plant growth*. London, Longmans Green & Co. 635 p.
- SAITO, S.M.T., 1978. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

- Piracicaba, ESALQ/USP. 96 p. (Tese de Doutorado).
- SARRUGE, R. e H.P. HAAG, 1974. Análise química quantitativa. Determinação do Nitrogênio. Curso Pós-Graduado de Nutrição Mineral das Plantas. Piracicaba. (mimeografado).
- SCHREVEN, van D.A., 1972. On the resistance of effectiveness of *Rhizobium trifolii* to a low pH. *Plant and Soil* 37:49-55.
- SCHUBERT, K.R., J.A. ENGELKE, S.A. RUSSEL e H.J. EVANS, 1977. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. *Plant Physiology*, 60:651-654.
- SCHWINGAMER, E.A., H.J. EVANS e M.D. DAWSON, 1970. Evaluation of the effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of N₂ fixation. *Plant and Soil*, 33:192-212.
- STEWART, W.D.P., 1966. *Nitrogen Fixation in Plants*. London, Athlone Press, 168 p.
- STEWART, W.D.P., G.P. FITZGERALD e R.H. BURRIS, 1967. "In situ" studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 58:2071-2078.
- TANNER, J.W. e I.C. ANDERSON, 1963. An external effect of inorganic Nitrogen in root nodulation. *Nature*, 198:303-304.

VICTÓRIA, R.L., 1975. Uso de $^{15}\text{N}_2$ com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. Piracicaba, ESALQ/USP, 93 p. (Tese de Mestrado).

VINCENT, J.M., 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scient. Publ. IPB, Handbook nº 15.

WELSH, C.D. e W.L. NELSON, 1950. Calcium and magnesium requirements of soybeans as related to the degree of base saturation of the soil. *Agronomy Journal*, 42:9-13.

WILSON, P.W., 1940. *The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation*. Madison, the University Wisconsin Press, pp.114-141.

ZEMELMAN, R., L.LONGERI e A. HERRERA, 1964. Efectividad comparativa de inoculantes comerciales y cepas naturales de *Rhizobium meliloti* en alfafa. Ia. Reunión Latinoamericana sobre inoculantes para leguminosas. Montevideo, Uruguay.