

USO DE $^{15}\text{N}_2$ COM BAIXO ENRIQUECIMENTO PARA TESTES DE FIXAÇÃO SIMBIÓTICA

REYNALDO LUIZ VICTORIA
ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

Orientador : DR. ENÉAS SALATI

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
- 1975 -

DEDICO

a meus pais
e à minha esposa

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

- Ao Prof. Enéas Salati pela amizade, paciência e orientação a mim dedicadas.
- Ao físico Eiichi Matsui pelo constante apoio.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa de seu diretor Prof. Admar Cervellini, pelas facilidades oferecidas.
- À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela bolsa de estudos concedida.
- A meus professores durante o Curso de Pós Graduação pelo conhecimento transmitido.
- Aos técnico-químicos Roberto Braidoti e Willians Thadeu e à funcionária Cacilda pelo valioso auxílio.
- Aos amigos Antonio Carlos Marconi, Benedito H. Davanzo, Cleusval Bissi e Cesar Zambello pela composição gráfica deste trabalho.
- A todos aqueles que de uma maneira ou outra comigo colaboraram.

I N D I C E

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3. MATERIAL E MÉTODO	15
3.1. Material	15
3.1.1. Sementes	15
3.1.2. Inoculantes	15
3.1.3. Vasos de plantio	16
3.1.4. Solução nutritiva	16
3.1.5. Espectrômetro de massa utilizado. Noções gerais e princípio de funcionamento	17
3.1.5.1. Sistema de admissão	17
3.1.5.2. Fonte ou câmara de ionização	20
3.1.5.3. Sistema analisador	21
3.1.5.4. Sistema de detecção	23
3.1.6. Fonte de ^{15}N	23
3.1.7. Amostra de referência utilizada	23
3.2. Método	23
3.2.1. Inoculação e plantio das sementes	23
3.2.2. Preparo da mistura de gases contendo $^{15}\text{N}_2$	24
3.2.2.1. Preparo do $^{15}\text{N}_2$	25
3.2.2.2. Preparo da mistura gasosa	27
3.2.3. Testes de fixação em raízes noduladas	28
3.2.4. Testes de fixação em planta inteira	31
3.2.5. Coleta de N_2 atmosférico	34
3.2.5.1. Oxidação de Cu metálico	35
3.2.5.2. Absorção de O_2 por solução pirogalol	37
3.2.6. Preparo das amostras	38
3.2.6.1. Método de Dumas modificado	38
3.2.6.2. Método de oxidação da amônia por <u>hi</u> pobromito de sódio	41
3.2.7. Análise das amostras	46
3.2.7.1. Análise isotópica utilizando coletor simples	46
3.2.7.2. Análise isotópica utilizando coletor duplo	50
3.2.8. Modificação introduzida no sistema de admissão de fluxo viscoso do espectrômetro	57

	<u>página</u>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Precisão analítica das medidas efetuadas	61
4.2. Análise de amostras de ar atmosférico	63
4.3. Variação natural do ¹⁵ N em amostras de feijão da variedade carioca	65
4.4. Testes de fixação em raízes noduladas	67
4.5. Testes de fixação em plantas inteiras	69
4.6. Comparação entre os métodos de Dumas modificado e o método de oxidação de amônia por hipobromito de sódio	74
4.7. Determinação do N total de uma amostra pela medida da pressão do gás liberado na combustão de Dumas	75
4.8. Determinação da quantidade de N ₂ fixada	77
5. CONCLUSÃO	81
6. RESUMO	84
7. SUMMARY	86
8. BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DAS FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>página</u>
1	Sistema utilizado por <i>BURRIS (1942)</i> para estudo de fixação de nitrogênio em <i>Azotobacter</i>	07
2	Sistema utilizado por <i>STEVENSON (1948)</i> para teste de fixação de nitrogênio atmosférico em plantas não noduladas	08
3	Câmara de crescimento utilizada por <i>ROSS et alii (1964)</i>	09
4	Arranjo experimental utilizado por <i>OGHOGHORIE & PATE (1972)</i> para estudos de transporte de <i>Nemervilha</i>	11
5	Diagrama de blocos de um espectrômetro de massa . .	17
6	Sistema de admissão de fluxo viscoso	18
7	Esquema do sistema de admissão de fluxo molecular.	19
8	Câmara de ionização por impacto de elétrons . . .	20
9	Sistema analisador de setor magnético de 60° . . .	22
10	Sistema utilizado para preparo do ¹⁵ N ₂	26
11	Sistema utilizado no preparo da mistura gasosa . .	29
12	Arranjo experimental utilizado para testes de fixação em raízes noduladas	30
13	Arranjo experimental utilizado para testes de fixação em plantas inteiras	32
14	Esquema da câmara utilizada	33
15	Sistema utilizado para purificação de N ₂ atmosférico através da oxidação de Cu metálico	36
16	Arranjo experimental utilizado para transferência da amostra	38
17	Tubos de vidro utilizados no preparo de amostras pelo método de Dumas modificado	40
18	Tubos utilizados para expansão do gás obtido na combustão de Dumas	42
19	Sistema de vácuo utilizado no preparo de amostras.	43
20	Tubo de Rittenberg utilizado no preparo de amostra pelo método de oxidação da amônia pelo hipobromito	45
21	Circuito de balanceamento para o método de ponto nulo	52
22	Modificação introduzida no sistema de admissão de fluxo viscoso	59

INDICE DOS QUADROS

<u>Quadro</u>		<u>página</u>
I	Estudos do ciclo do nitrogênio com auxílio de ^{15}N segundo HAUCK (1971)	05
II	Critério estabelecido para aquecimento e combustão da amostra pelo método de Dumas modificado	39
III	Sensibilidade de análise em função da pressão da amostra	57
IV	Resultado das análises de amostras de fruto de feijão da variedade carioca	62
V	Análise estatística para diversas amostras possuindo $\delta^{15}\text{N}^{\text{‰}}$ diferentes	63
VI	Resultados das análises de amostras de ar atmosférico	64
VII	Resultado das análises de diversas amostras de feijão da variedade carioca	66
VIII	Composições das misturas gasosas utilizadas nos testes de fixação em raízes noduladas	67
IX	Resultados das análises de amostras obtidas nos testes de fixação em raízes noduladas	68
X	Análises do gás da câmara feitas no decorrer dos experimentos	70
XI	Resultado das análises das amostras dos testes de fixação com plantas inteiras	71
XII	Resultados obtidos em análises de amostras de diversos materiais pelos métodos de Dumas modificado e oxidação por NaOBr	74
XIII	Comparação entre os resultados de N total obtidos pelos métodos de Kjeldahl e pela medida da pressão de gás produzida no método de Dumas	76
XIV	Cálculo da quantidade de N_2 fixado e da razão de fixação para os experimentos realizados	79

INDICE DOS GRÁFICOS

<u>Gráfico</u>		<u>página</u>
1	Gráfico obtido em uma análise feita pelo método de duplo coletor	53
2	Variações nas concentrações e teor de ^{15}N na mistura gasosa, nos três experimentos	72

1. INTRODUÇÃO

É fato inquestionável a importância do nitrogênio em todos os processos vitais conhecidos, e, a despeito dessa importância, a forma de nitrogênio mais abundante na natureza, que é o nitrogênio gasoso existente na atmosfera numa proporção de 79% em volume, não pode ser prontamente utilizada pela maior parte dos organismos vivos. Ele necessita ser primeiramente fixado por organismos especializados, por processos físico-químicos naturais, ou por processos industriais.

Já por volta de 1830 era grande a preocupação em saber se

as plantas conseguiam ou não utilizar o nitrogênio atmosférico diretamente. Assim, grandes nomes como Bossingault, Gilbert, Liebig e outros concentravam seus esforços na tentativa de descobrir a resposta para tal questão. Alguns anos mais tarde ficou demonstrada a existência de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, quer por certos microorganismos que viviam livremente no solo, quer por outros que viviam em simbiose com certas plantas hospedeiras. Tais descobertas se devem a Hellriegel & Wilfarth, Berthelot, Winograsky e Beijerinck (*WILSON, 1971*).

Em 1929, Naude descobriu o isótopo do nitrogênio de massa 15. Dez anos mais tarde, Thode & Urey conseguiram a separação de tal isótopo, o que possibilitou a obtenção de compostos enriquecidos em ^{15}N . Em 1941 Burris & Miller utilizavam atmosferas contendo nitrogênio enriquecido em ^{15}N para estudos de fixação biológica de nitrogênio. A partir daí, e também devido ao rápido desenvolvimento da espectrometria de massa, muitos foram os trabalhos que se serviram do uso de ^{15}N como traçador para estudo da fixação biológica de nitrogênio. Na maioria de tais trabalhos verifica-se que a fonte de nitrogênio utilizada é altamente enriquecida em ^{15}N . Tal fato constitui-se em um fator seriamente limitante das pesquisas que envolvem o uso de ^{15}N , devido ao alto preço de tal isótopo. (*BRENNER, 1965*).

Os processos de fracionamento isotópico que podem ocorrer nas diversas etapas do ciclo de nitrogênio não estão ainda bem estabelecidos, o que nos tira a possibilidade de aplicação imediata da variação natural do nitrogênio 15 no estudo da fixação biológica do nitrogênio.

Baseando-se em tais fatos, os objetivos principais do presente trabalho são:

1. desenvolvimento de uma metodologia que permita o uso de atmosferas contendo N_2 com baixa concentração em ^{15}N para testes da fi-

xação simbiótica de nitrogênio. Usar-se-á como planta teste o feijão. (*Phaseolus vulgaris*, L.)

2. estabelecimento de um método de coleta de N_2 do ar atmosférico.
3. fornecimento de dados sobre a variação natural do ^{15}N na planta de feijão e no ar atmosférico.
4. medida do teor de N total da planta, por método gasométrico, diretamente no sistema de admissão do espectrômetro de massa. Comparação com o método de Kjeldhal.
5. comparação entre os métodos de Dumas e Rittenberg de preparo de amostras para análise isotópica de N_2 .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe atualmente um grande número de pesquisadores estudando as diversas fases do ciclo do N na biosfera com o auxílio de ^{15}N . Uma das fases de maior interesse para o homem é a fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

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

NUTMAN, citado por *HAUCK (1973)*, estima que cerca de 100 milhões de toneladas métricas de nitrogênio são biologicamente fixadas anualmente, considerando todos os processos.

THODE & UREY, citados por *BERGERSEN (1973)*, em 1939 foram os primeiros a conseguir obter compostos enriquecidos em ^{15}N . A partir daí começaram a aparecer trabalhos utilizando ^{15}N como traçador.

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. Fornece-nos o seguinte quadro:

Área de Estudo	Número de Trabalhos				
	1942-55	56-60	61-65	66-68	total
Mineralização e Imobilização	11	8	7	23	49
Retirada de N pelas culturas	3	6	38	53	100
Fixação Biológica	50	36	29	38	153
Retenção de Amônia	-	2	5	3	10
Perdas de N	2	3	11	11	27
Movimento de N	-	1	2	-	3
Balanco de N	-	1	4	13	18
Metodologia	24	19	31	26	100

Quadro I - Estudos do ciclo do nitrogênio com auxílio de ^{15}N segundo *HAUCK (1971)*.

Nota-se que os primeiros trabalhos estavam voltados diretamente para o estudo da fixação biológica de nitrogênio e da metodologia de uso de ^{15}N . O número de trabalhos em metodologia de uso permaneceu mais ou menos constante com o passar do tempo. O autor cita também que uma das principais limitações do uso de ^{15}N como

traçador é o seu alto preço e que existe uma grande necessidade de serem desenvolvidos novos métodos que possam simplificar e reduzir o custo de experimentos com tal isótopo.

BURRIS (1942) foi o primeiro a dar uma descrição completa de um experimento utilizando ^{15}N em fixação biológica. Utilizando-se do sistema indicado na Figura 1, e de culturas puras de *Azotobacter vinelandii*, mostrou que o ácido glutâmico continha maior teor de ^{15}N após 90 minutos de exposição a uma atmosfera contendo 40% de O_2 e 60% de N_2 enriquecido a 35% em ^{15}N .

BURRIS et alii (1943) provaram que a fixação de N_2 em leguminosas ocorria nos nódulos e que o nitrogênio fixado era rapidamente translocado para a parte aérea das plantas.

STEVENSON (1958) utilizou-se de um sistema como o indicado na Figura 2 para testar a fixação de nitrogênio atmosférico em plantas não noduladas.

O autor utilizou-se das mais variadas combinações na percentagem de N_2 e O_2 na atmosfera utilizada, no enriquecimento em ^{15}N e no tempo de cada experimento. As espécies vegetais utilizadas também foram muitas.

ROSS et alii (1964) construíram uma câmara de crescimento para estudos de balanço de nitrogênio. Um esquema é apresentado na Figura 3.

Utilizaram-se de tal câmara para estudo de fixação biológica de N_2 em *Phaseolus atropurpureus*. Em três experimentos levados a efeito utilizaram-se de N_2 enriquecido a 4,1; 3,4 e 7,1% de ^{15}N , entrando o mesmo na proporção de 18, 29 e 16% da mistura gasosa, respectivamente. Os resultados obtidos foram significativos. Os autores sugeriram também outros tipos de experimentos para os quais a câmara poderia ser utilizada.

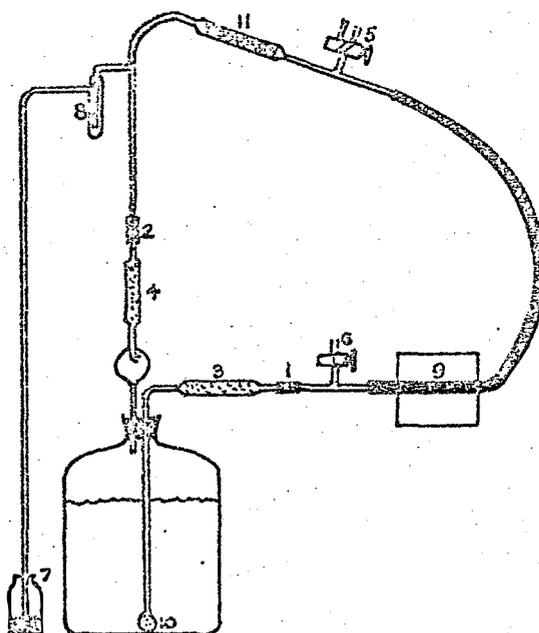


Figura 1 - Sistema utilizado por BURRIS (1942) para estudo de fixação de nitrogênio em *Azotobacter*.

- 1 e 2 - conexões de borracha
- 3 e 4 - filtros de algodão
- 5 - torneira de conexão para o vácuo
- 6 - torneira de admissão de gás contendo $^{15}\text{N}_2$
- 7 - manômetro de mercúrio
- 8 - "trap" para congelamento de vapor de Hg
- 9 - bomba peristáltica
- 10 - vidro sinterizado
- 11 - "trap" contendo cal-sodada para absorção de CO_2

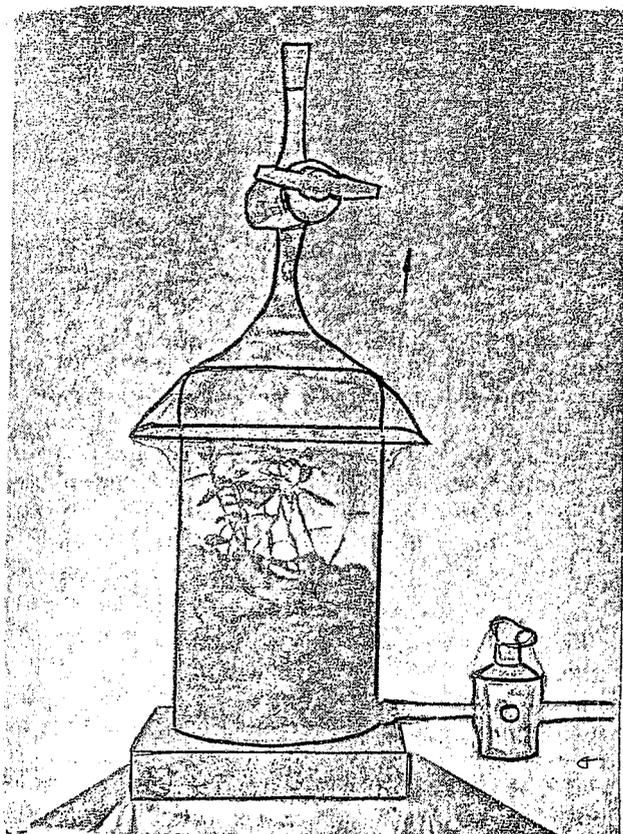


Figura 2 - Sistema utilizado por *STEVENSON* (1948) para teste de fixação de nitrogênio atmosférico em plantas não noduladas.

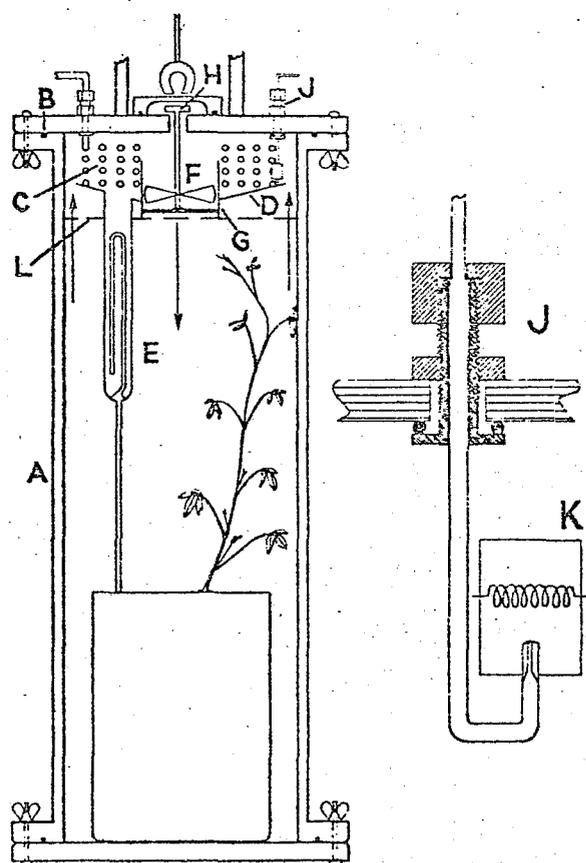


Figura 3 - Câmara de crescimento utilizada por ROSS et alii (1964)

- A - cilindro de "Perpex"
- B - "O" ring
- C - Espirais para condensação de H_2O
- D - Coletor de H_2O condensada
- E - Sifão
- F - Ventilador
- G - Tubulação do ventilador
- H - Magneto do ventilador
- J - Microqueimador de H_2
- K - Filamento de ignição
- L - Tela metálica

OGHOGHORIE & PATE (1972) estudaram o transporte de nitrogênio em ervilha (*Pisum arvense*, L.), utilizando-se de atmosferas contendo 20% de O₂ e 80% de N₂ enriquecido a 95% em ¹⁵N. As plantas eram colocadas em kitassatos conforme indica o esquema na Figura 4.

RUSCHEL *et alii* (1974) utilizaram-se de um sistema semelhante ao descrito anteriormente para estudos de fixação biológica de N₂ em cana-de-açúcar.

DELWICHE & WIJLER (1956) estudaram a fixação biológica de ¹⁵N em solos da Califórnia, variando as condições de pH, nível de substrato e tensão de oxigênio.

MAYLAND & McINTOSH (1966) forneceram dados sobre fixação de N₂ em gramíneas de deserto. As plantas eram incubadas por longo tempo, em um dissecador contendo 74,8% de N₂ enriquecido a 0,53% de ¹⁵N, 4,9% de CO₂, 20% de O₂ e 0,3% de Ar. Os resultados conseguidos foram significativos.

Vários são os autores que trabalharam com nódulos destacados e raízes noduladas de plantas leguminosas ou não, para estudar diversos aspectos da fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Dentre eles poderíamos citar: APRISON & BURRIS (1952), BECKING (1965), HARRIS & MORRISON (1958), BOND (1961), BURRIS *et alii* (1955), BOND & MACCONNELL (1955), KLUCAS & BURRIS (1967), MACHATA *et alii* (1947), MURRISON (1961), MAGEE & BURRIS (1954), RAGGIO *et alii* (1959), TOVE *et alii* (1950), VIRTANEN *et alii* (1954) e VIRTANEN *et alii* (1955).

Quanto ao estudo das variações naturais de ¹⁵N, vários são os pesquisadores que a ele já se dedicaram e podemos dizer que atualmente é grande a tendência para pesquisas neste campo.

NIER (1950) determinou a relação ¹⁴N/¹⁵N no ar atmosférico como sendo constante e igual a 273.

DOLE *et alii* (1954) estudaram a composição isotópica do ni-

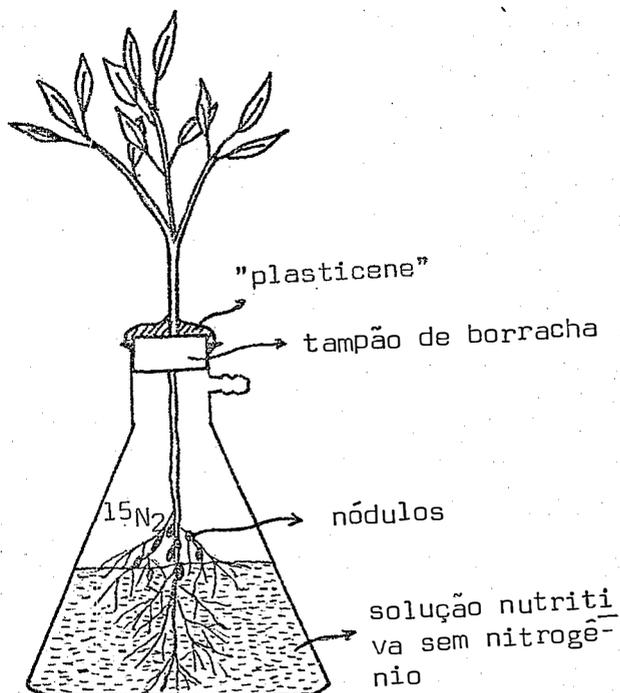


Figura 4 - Arranjo experimental utilizado por *OGHOGHORIE & PATE* (1972) para estudos de transporte de N em ervilha.

nitrogênio atmosférico a várias altitudes não encontrando variação significativa.

HOERING (1955) estudou a variação natural do ^{15}N em diversas substâncias, tomando como padrão o N_2 atmosférico. Os resultados são apresentados em termos de $\delta^{15}\text{N}$ ‰ de variação, e estão dentro de uma escala que vai de -13 ‰ até $+13$ ‰.

PARWEL et alii (1957) estudaram a variação natural do ^{15}N em diversos materiais com o objetivo de ter alguma idéia sobre a magnitude da variação. O padrão utilizado foi o N_2 atmosférico do qual o O_2 era retirado por meio de uma solução de pirogalol.

HOERING (1957) estudou a composição isotópica dos íons amônia e nitrato em águas de precipitação, levando em conta o efeito isotópico causado pela faísca elétrica quando da fixação do N_2 atmosférico através de descarga elétrica.

HOERING & MOORE (1958) estudaram a composição isotópica do nitrogênio em gases naturais e óleos e também os processos que poderiam causar fracionamento dos isótopos de nitrogênio em tais gases.

JUNK & SVEC (1958) determinaram a composição isotópica do N_2 atmosférico e do N_2 proveniente de gases comprimidos de várias fontes.

DELWICHE & STEYN (1970) estudaram o fracionamento isotópico do nitrogênio que ocorre em perfis de solos e em reações microbiológicas tais como fixação simbiótica e assimbiótica de N_2 atmosférico, nitrificação e denitrificação.

KOHL et alii (1971), através da determinação do $\delta^{15}\text{N}$ ‰ do íon nitrato em águas superficiais e em águas de drenagem de um campo cultivado com milho, analisaram a quantidade de nitrato proveniente de fertilizantes e que era descarregada em águas superficiais.

FEIGIN et alii (1974a) estudaram a variação natural do ^{15}N de nitratos mineralizados durante a incubação de diversos solos. A apresentam alguns valores de $\delta^{15}\text{N}$ para nitrogênio do solo e de plantas.

KOHL et alii (1973) estudaram a variação natural do ^{15}N em plantas de milho e no solo após a aplicação de um fertilizante nitrogenado.

SHEARER et alii (1974b) desenvolveram um modelo matemático para estudo do fracionamento isotópico que acompanha as transformações do nitrogênio no solo.

FEIGIN et alii (1974b) estudaram a concentração e o $\delta^{15}\text{N}^0/\text{oo}$ do nitrato presente em solos, como função da profundidade e do tempo.

HAUCK (1973) comentou as possibilidades de uso e as dificuldades encontradas no emprego da variação natural do ^{15}N para estudo de sistemas biológicos.

Vários outros autores trabalharam em problemas envolvendo a variação natural do ^{15}N ou o fracionamento isotópico do nitrogênio em sistemas biológicos. Podemos citar: *HOERING (1956)*, *BOWEN (1960)*, *HOERING et alii (1960)*, *CHENG et alii (1964)* e *HAUCK et alii (1965)*.

Sobre a metodologia de uso do ^{15}N encontramos na literatura diversos trabalhos, dos quais citaremos os seguintes:

BREMNER (1965) discutiu a metodologia e os detalhes envolvidos na análise isotópica de nitrogênio do solo.

BERGERSEN (1973) discutiu os problemas e cuidados a serem tomados no uso de ^{15}N em experimentos de fixação biológica de N_2 .

RITTENBERG (1946) descreveu um método para preparo de amostras para análise isotópica de nitrogênio.

PROKSCH (1969) apresentou uma comparação entre os métodos de preparo de amostras de Dumas e Rittenberg para análise isotópica de material vegetal.

FIEDLER & PROKSCH (1972) descreveram um método de determinação de N total através da medida da pressão do gás liberado em uma combustão de Dumas. A pressão era medida no sistema de admissão do espectrômetro quando o gás era admitido para análise isotópica.

RENNIE & PAUL (1971) descreveram a metodologia e técnicas por eles empregadas para estudos de nutrição e fisiologia de plantas com o auxílio de ^{15}N .

TRIVELIN et alii (1973) descreveram a metodologia utilizada nos laboratórios do CENA para preparo e análise das amostras de material contendo ^{15}N .

BURRIS (1974) descreveu os métodos por ele utilizados para estudos de fixação biológica de N_2 atmosférico.

BREMNER et alii (1966) discutiram a probabilidade de fracionamento isotópico em reações do ciclo de nitrogênio e os possíveis erros que poderão existir dentro da metodologia de trabalho com ^{15}N , devido ao fracionamento.

HAUCK & BREMNER (1964) discutiram a metodologia utilizada em estudos de nitrogênio do solo com o emprego de ^{15}N . Apontaram os possíveis fracionamentos isotópicos e as fontes de erro no preparo de amostras.

SHEARER et alii (1974a) apresentaram dados sobre a precisão com que pode ser medida a variação natural do ^{15}N em solos, fertilizantes e produtos químicos.

HAUCK & BYSTRON (1970) fizeram uma revisão bibliográfica sobre as diversas possibilidades de uso do ^{15}N em estudos do ciclo do nitrogênio.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Material

3.1.1. Sementes

Foram utilizadas sementes de feijão da variedade Carioca fornecidas pelo Setor de Microbiologia do Solo - CENA.

3.1.2. Inoculantes

Os inoculantes utilizados foram também fornecidos pelo Setor de Microbiologia do Solo - CENA e foram:

- a. inoculante 127K14 - isolamento proveniente do IPEACS - km 47, Rio de Janeiro.

b. inoculante 127K17 - isolamento proveniente do IPEACS - km 47, Rio de Janeiro.

c. inoculante CO1 - isolamento feito pelo Setor de Microbiologia do Solo - CENA.

3.1.3. Vasos de plantio

Foram utilizados sacos e vasos plásticos cheios de sílica esterilizada em autoclave.

3.1.4. Solução nutritiva

As plantas sofreram irrigação diária com uma solução nutritiva sem nitrogênio cuja composição foi a seguinte (NORRIS, 1964):

I	-	KCl	0,002M	10ml/1 solução
II	-	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,002M	10ml/1 solução
III	-	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,004M	10ml/1 solução
IV	-	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002M	10ml/1 solução
V	-	a. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,02ppm	} Micronutriente: 0,5 ml da sol. estoque por litro de solução
		b. $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05ppm	
		c. $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05ppm	
		d. $(NH_4)_2MoO_4$	0,005ppm	
		e. H_3BO_3	0,25ppm	
VI	-	a. sulfato de ferro	0,5%	} 0,5 ml do estoque por litro de solução
		b. ácido cítrico	0,5%	

Para se preparar misturou-se primeiramente I, II e IV, depois adicionou-se V e VI e por último III.

Servindo como "starter" para alguns casos em que as plantas apresentaram deficiência de nitrogênio foi utilizada uma solução de nitrato de amônio a 1%, colocando-se cerca de 5 ml da solução por vaso.

3.1.5. Espectrômetro de massa utilizado. Noções gerais e princípio de funcionamento.

As análises isotópicas foram feitas em um espectrômetro de massa Atlas-Varian modelo CH-4.

De uma maneira geral um espectrômetro de massa é constituído de 4 partes básicas, indicadas no esquema da Figura 5.

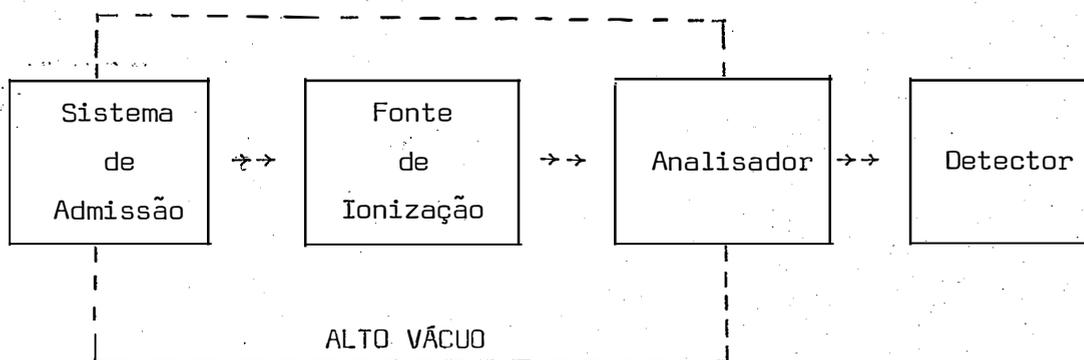


Figura 5 - Diagrama de blocos de um espectrômetro de massa (DUCATTI et alii, 1974).

3.1.5.1. Sistema de admissão

É o sistema através do qual a amostra a ser analisada, convenientemente preparada, é introduzida na câmara de ionização. O vácuo para este sistema geralmente é obtido com auxílio de uma bomba de vácuo rotativa e uma bomba de difusão a óleo ou de mercúrio. O espectrômetro usado possui dois sistemas de admissão, ou sejam o de fluxo viscoso e o de fluxo molecular.

- a. Sistema de admissão de fluxo viscoso - é utilizado para admissão de amostras nas quais se pretende determinar pequenas variações nas concentrações isotópicas. A amostra é comparada com um padrão cuja composição isotópica absoluta é conhecida. É necessário que o fluxo seja viscoso para que a composição isotópica dos reservatórios não se altere com o escoamento. Na Figura 6 vemos o esquema de tal sistema.

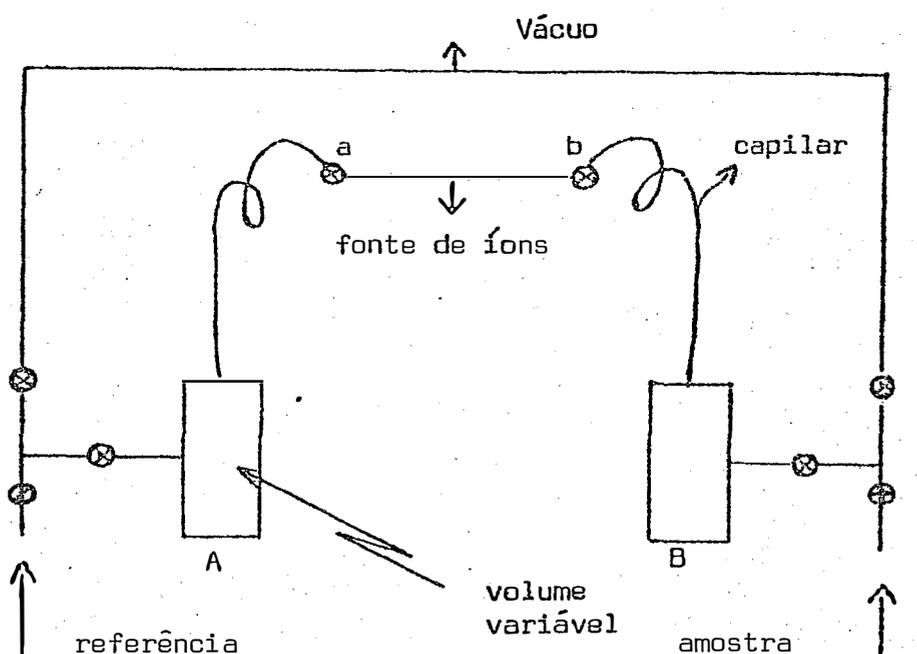


Figura 6 - Sistema de admissão de fluxo viscoso

b. Sistema de admissão de fluxo molecular - é utilizado para introdução de amostras das quais se deseja analisar a composição de gases e na determinação da abundância isotópica absoluta. Em um fluxo molecular não ocorre a discriminação dos componentes pela viscosidade, embora haja fracionamento para moléculas de diferentes massas. Para que a composição do gás no reservatório não se altere significativamente durante a análise, é necessário que este reservatório seja grande. Embora sofra o fracionamento citado, o gás na fonte tem composição praticamente igual à do reservatório, pelo efeito contrário causado pelo sistema de bombeamento. Na Figura 7 vê-se um esquema deste sistema.

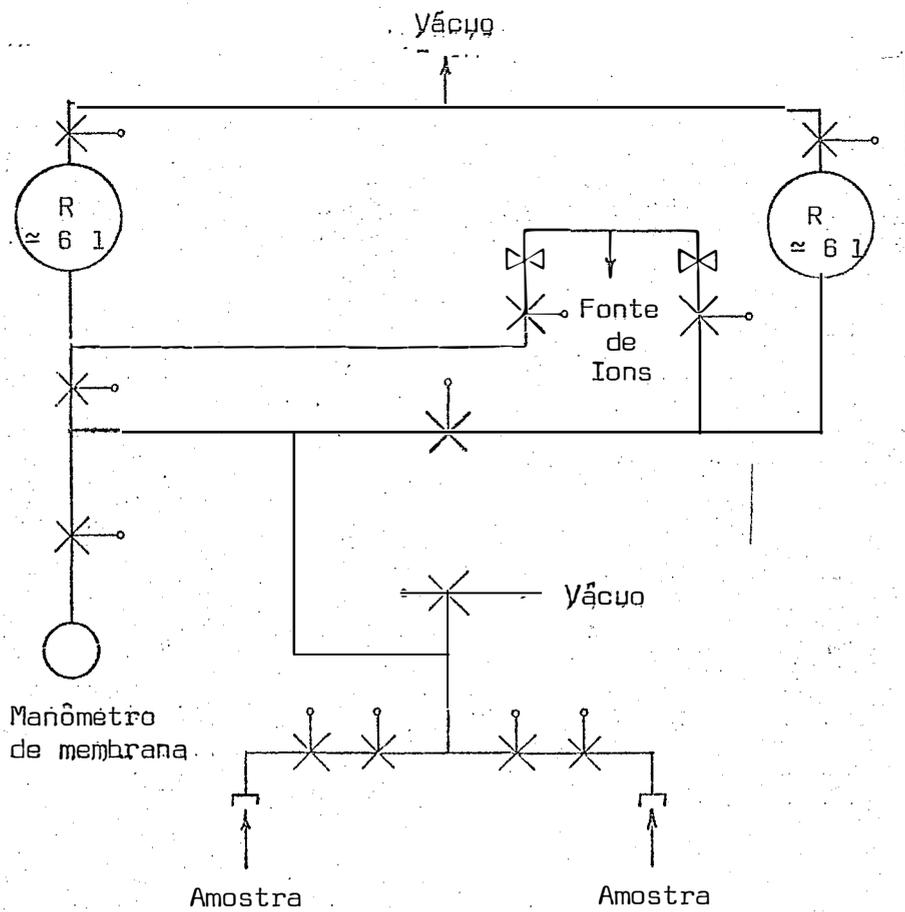


Figura 7 - Esquema do sistema de admissão de fluxo molecular.

⊗ = Válvulas de alto vácuo.

R = Reservatório de amostra.

3.1.5.2. Fonte ou câmara de ionização

É o local onde a amostra é ionizada. O espectrômetro usado trabalha com uma câmara de ionização de impacto de elétrons. Na Figura 8 vemos um esquema de uma câmara de tal tipo.

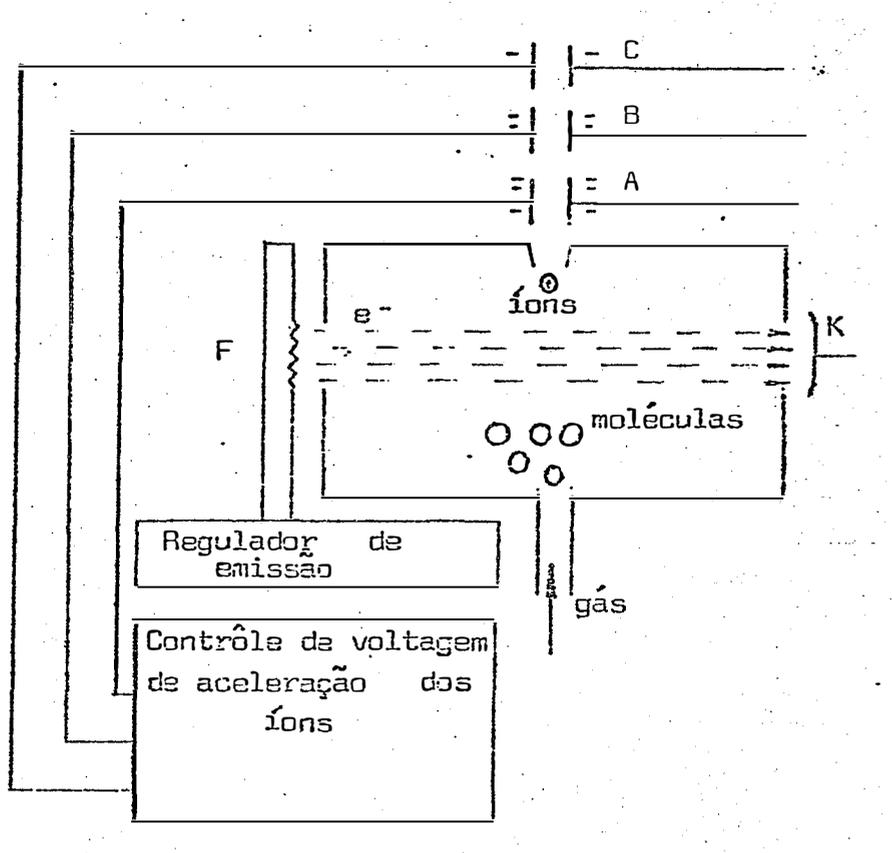


Figura 8 - Câmara de ionização por impacto de elétrons

Cumpramos dizer que a ionização existe para a amostra e para qualquer outro gás existente na câmara, razão pela qual o vácuo nesta região deve ser da ordem de 10^{-7} mm de Hg, a fim de eliminar possíveis interferências.

Os elétrons emitidos pelo filamento aquecido são acelerados

e penetram na câmara, ionizando as moléculas ou átomos do gás. Os íons são acelerados pelas placas aceleradoras A, B e C que estão a um potencial negativo em relação a câmara. Estas placas tem a função de puxar os íons formados, focalizá-los e introduzi-los no tubo analisador.

3.1.5.3. Sistema analisador

É o sistema no qual o feixe de íons é introduzido e separado em seus diversos componentes de diferentes massas (Figura 9).

Sabe-se que quando um íon de massa M, carga q e acelerado por uma diferença de potencial V penetra num campo magnético de intensidade H, numa trajetória normal às linhas de indução deste campo, ele descreve uma trajetória que é um arco de circunferência, cujo raio r está definido na equação abaixo (DUCKWORTH, 1950):

$$\frac{M}{q} = 4,82 \times 10^{-5} r^2 H_2/V \dots \dots \dots (1)$$

onde:

M = massa do íon em uam

q = carga do íon medida em termos do número de elétrons removidos

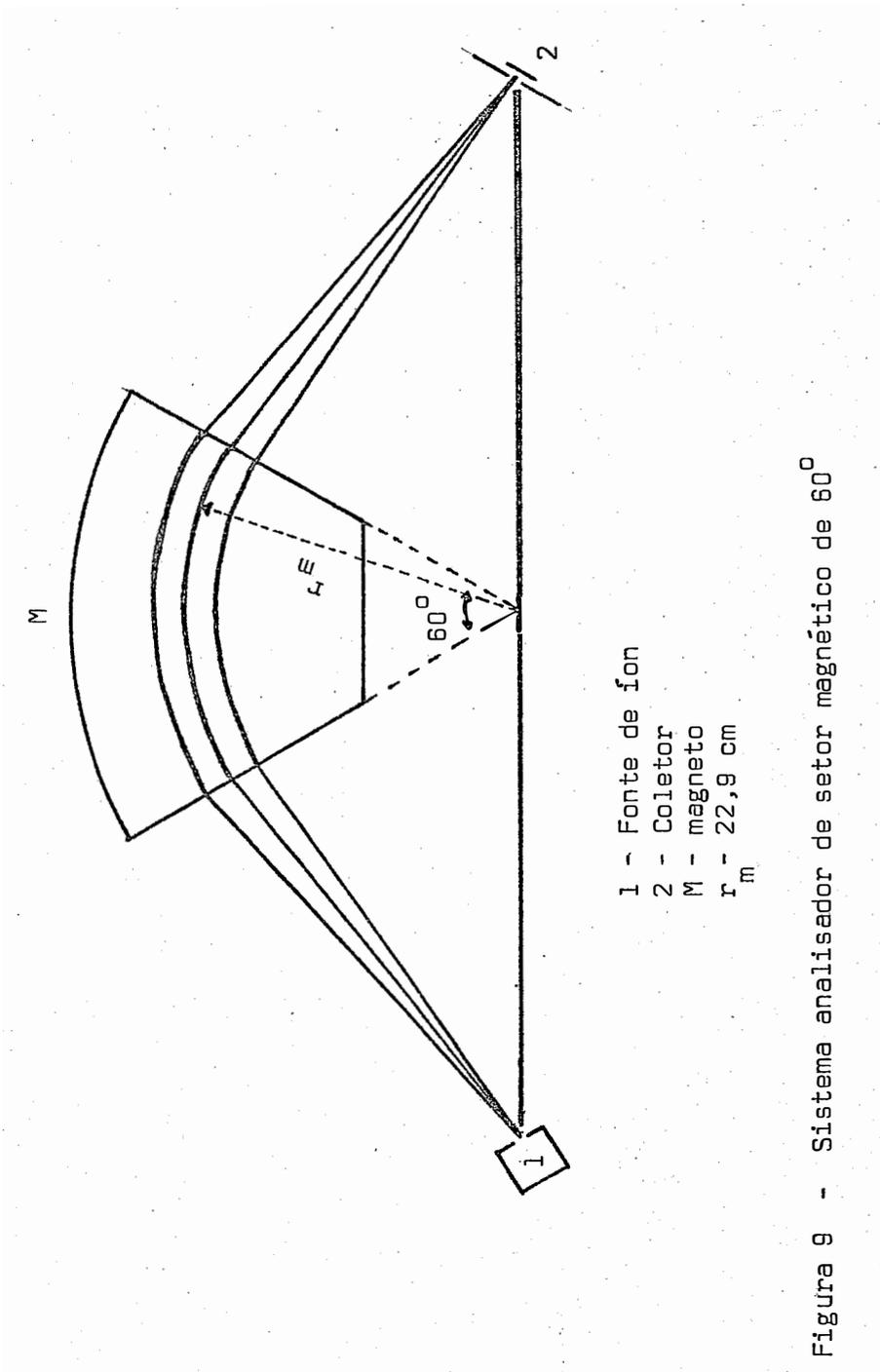
r = raio de curvatura em cm

H = intensidade do campo magnético medida em Gauss

V = potencial de aceleração medido em volts

Se as partículas forem ionizadas de tal forma que q = 1 e se V e H forem constantes, vemos pela equação (1) que o raio descrito será proporcional à raiz quadrada da massa M. Se ajustarmos convenientemente V ou H ou ambos, poderemos fazer com que partículas com diferentes massas descrevam um raio r bem definido penetrando num sistema de detecção.

Hergog demonstrou que um setor magnético, além de separar



íons em função da razão M/q, promove uma focalização dos mesmos. O sistema analisador do CH-4 é constituído por um setor magnético de 60° com um raio de curvatura do feixe de íons de 22,9 cm.

3.1.5.4. Sistema de detecção

Neste sistema os feixes de íons de massas distintas são coletados e suas intensidades medidas.

Os métodos de medida utilizando coletor simples ou coletor duplo estão descritos em 3.2.7.1. e 3.2.7.2..

3.1.6. Fonte de ^{15}N

O ^{15}N estava originalmente na forma de sulfato de amônio $|(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4|$ enriquecido a 5,01% em ^{15}N . O material foi fornecido ao Setor de Ciências do Ambiente do CENA pela Agência Internacional de Energia Atômica.

3.1.7. Amostra de referência utilizada

Foi utilizado como referência para medida de variação na relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ o gás nitrogênio puro de um cilindro, cuja análise prévia, pelo método de coletor simples, revelou uma abundância isotópica absoluta de 0,358 átomos % de ^{15}N .

3.2. Métodos

3.2.1. Inoculação e plantio das sementes

As sementes, antes de serem inoculadas, passaram por um processo de esterilização. Esta esterilização foi feita da seguinte forma:

- a. lavagem das sementes com álcool absoluto por um tempo de 3 minutos.

- b. lavagem com solução de Q-Boa a 10% por 3 minutos.
- c. lavagens sucessivas com água esterilizada.

Em seguida as sementes foram inoculadas. Das culturas dos *Rhizobium* a serem usados como inoculante foi feita uma suspensão em água esterilizada; as sementes foram adicionadas a esta suspensão. As sementes destinadas a tratamento testemunha não foram inoculadas.

O plantio foi feito em sacos e vasos plásticos com sílica esterilizada. Foram postas 10 sementes em cada recipiente. Após a germinação, as plantas dos sacos plásticos sofreram desbaste, deixando-se 3-4 plantas por recipiente. Estas plantas eram destinadas aos testes de fixação com plantas inteiras. As dos vasos plásticos não sofreram desbaste e foram destinadas aos testes de fixação em raízes noduladas.

As plantas sofreram irrigação diária com solução nutritiva. A solução utilizada está descrita em 3.1.4. Em alguns casos de deficiência inicial de nitrogênio foram aplicados cerca de 5 ml por vaso de uma solução de nitrato de amônio a 1%.

3.2.2. Preparo de mistura de gases contendo $^{15}\text{N}_2$

A composição do gás a ser utilizado foi, em princípio, a seguinte:

- 20% de N_2 enriquecido a 5,01% em ^{15}N
- 20% de O_2
- 59,5% de Ar
- 0,5% de CO_2

Utilizou-se esta baixa concentração de N_2 porque mesmo assim o sistema enzimático que atua no processo de fixação de nitrogênio encontra-se saturado (BERGERSEN, 1973).

3.2.2.1. Preparo do $^{15}\text{N}_2$

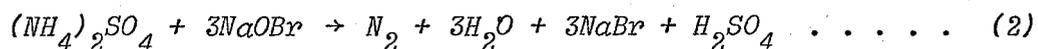
O $^{15}\text{N}_2$ foi preparado a partir de sulfato de amônio ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ através de oxidação do mesmo por hipobromito de sódio (NaOBr) (RITTENBERG, 1946).

O preparo da solução de hipobromito de sódio foi feito de acordo com TRIVELIN *et alii* (1973).

O sistema utilizado para o preparo do gás pode ser visto na Figura 10.

Passemos agora a descrever as operações necessárias. Primeiramente a quantidade de sulfato necessária à produção da quantidade desejada de gás N_2 foi colocada no balão B. Depois de fechado foi feito vácuo no sistema inteiro com o auxílio de uma bomba de difusão a óleo (2) e de uma bomba rotativa (1). A torneira C permite que seja feito vácuo diretamente no balão D.

Depois de feito vácuo, fechou-se a torneira A e iniciou-se a reação de produção de N_2 , pondo-se em contato o hipobromito com o sulfato através do funil E e torneira F. Deve-se tomar bastante cuidado para evitar contaminação do gás produzido, pelo ar atmosférico. A reação é a seguinte (RITTENBERG, 1946):



BREMNER (1965) cita duas dificuldades no uso de tal método:

a. o hipobromito decompõe-se facilmente em NaBr e O_2



Isto pode ser evitado tomando-se o cuidado de manter o reagente a baixa temperatura, tanto na preparação como na conservação e utilização. A adição de 0,1% de KI ao reagente também ajuda a evitar tal decomposição.

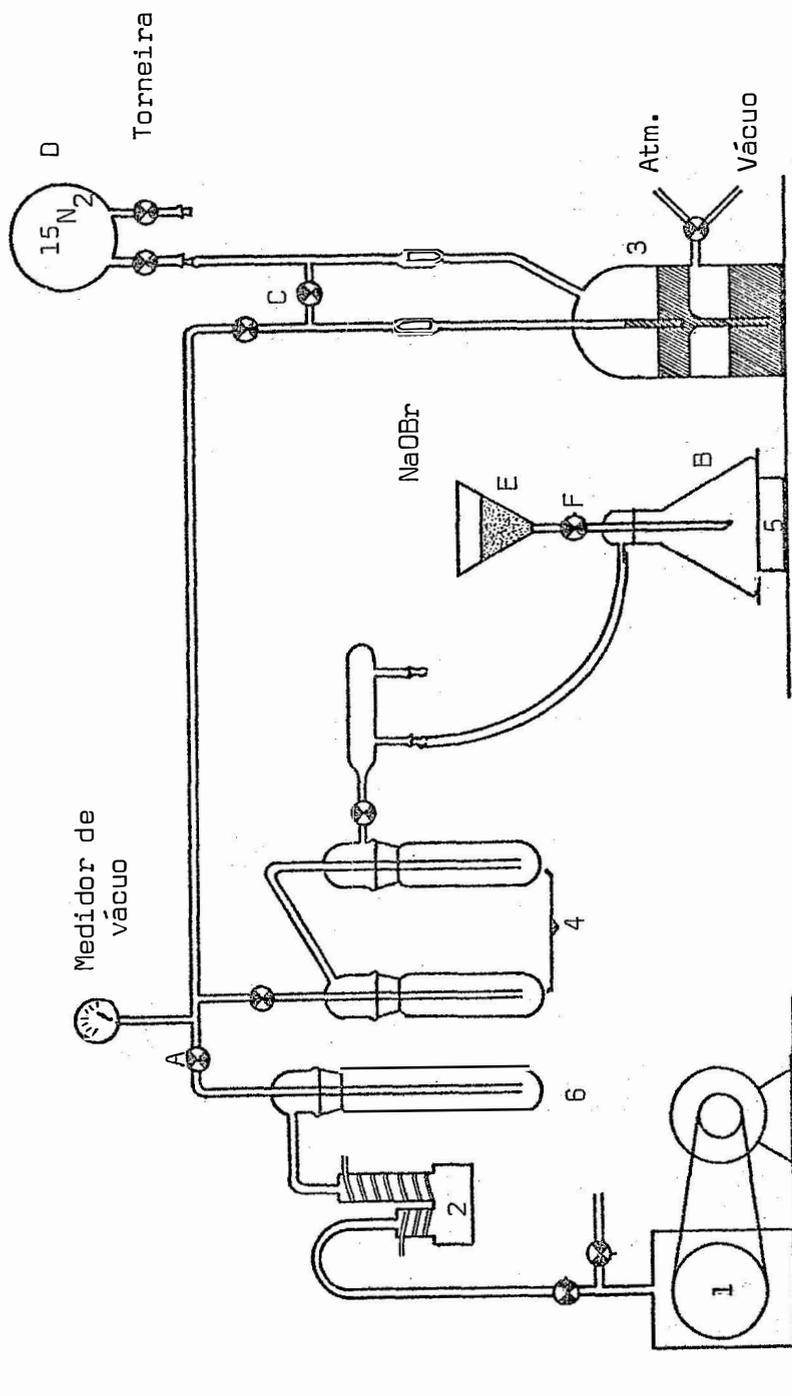


Figura 10 - Sistema utilizado para preparo do $^{15}\text{N}_2$.

b. a conversão de amônio a N_2 por oxidação com hipobromito não é quantitativa.

Além disso, existe ainda o problema da possível formação de óxidos de nitrogênio, e Br_2 durante a reação. Estes gases podem ser eliminados condensando-os com nitrogênio líquido nos "traps" (4)

O gás produzido em B foi transferido para o balão D através da bomba Toepler (3), mantendo-se fechada a torneira C.

3.2.2.2. Preparo da mistura gasosa

A mistura gasosa deve ter seus componentes na seguinte proporção percentual:

20% de N_2
20% de O_2
59,5% de Ar
0,5% de CO_2

Suponhamos que nosso balão reservatório tenha um volume de 2 litros. Então os componentes da mistura devem estar na seguinte proporção volumétrica:

0,4 l de N_2
0,4 l de O_2
1,19 l de Ar
0,01 l de CO_2

ou ainda, aproximadamente:

144 mm de Hg de N_2
144 mm de Hg de O_2
423 mm de Hg de Ar
3,5 mm de Hg de CO_2

sendo a pressão atmosférica, em Piracicaba, aproximadamente igual a 714 mm de Hg.

Após serem conseguidos os 144 mm de Hg de N_2 , conforme está descrito em 7.2.1., adicionamos os gases restantes, na quantidade calculada, para fazer a mistura. O sistema utilizado é mostrado na Figura 11.

Os gases foram admitidos até a quantidade calculada, o que se conseguiu pela simples leitura de pressão no manômetro de mercúrio.

É algo difícil obter-se uma mistura em que seus componentes estejam na proporção realmente desejada, uma vez que o processo está sujeito a pequenos erros, tais como:

- a. possível contaminação da mistura pelo ar atmosférico, proveniente de falhas humanas e vazamentos nas linhas de vácuo utilizadas.
- b. erro de leitura de manômetro, uma vez que as aproximações são grosseiras.
- c. possível liberação de O_2 pelo hipobromito.

3.2.3. Teste de fixação em raízes noduladas

As plantas dos vasos plásticos, com idade de mais ou menos 30 dias, foram colhidas, lavando-se as raízes cuidadosamente e separando-as da parte aérea.

As raízes foram colocadas em erlemeyers de 50 ml, e expostas à mistura de gases, conforme indica o esquema na Figura 12.

Feito o vácuo, admitiu-se a mistura gasosa nos erlemeyers, comprimindo-se o gás do balão B com água destilada, até que fosse atingida a pressão atmosférica lida no manômetro de mercúrio. Ao mesmo tempo coletava-se uma amostra do gás no balão C. Esta amostra foi analisada para controle da composição da mistura gasosa e do seu enriquecimento em ^{15}N , em cada experimento. Sempre um erlemeyer não sofria exposição à mistura gasosa, permanecendo no ar atmosférico para servir de testemunha.

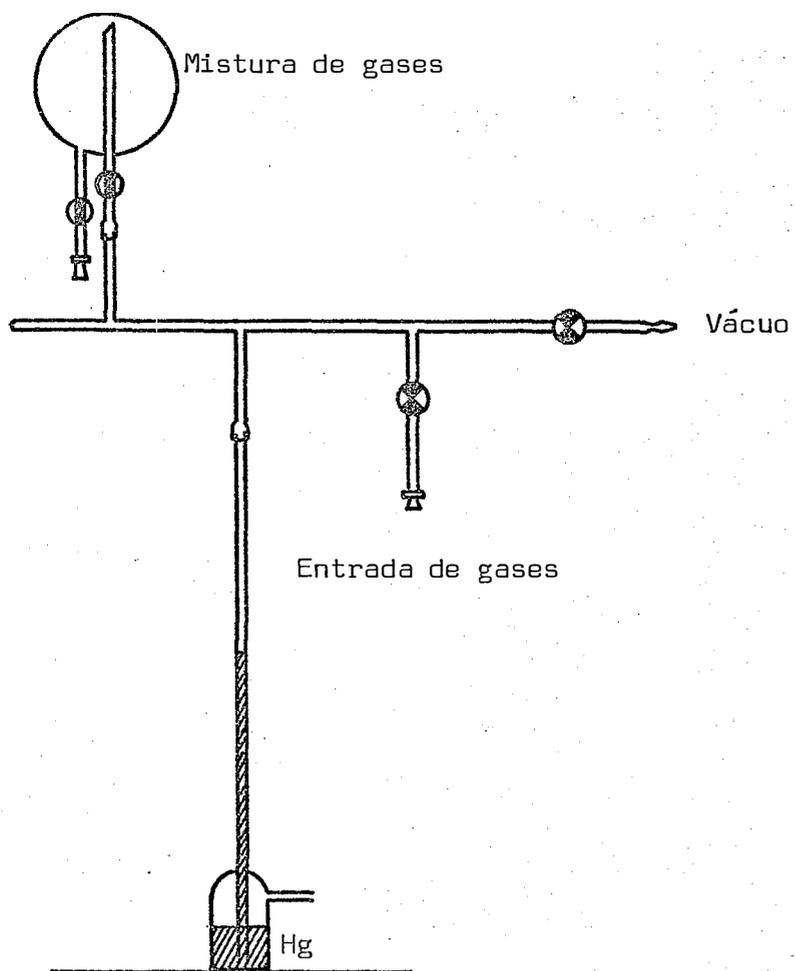


Figura 11 - Sistema utilizado no preparo da mistura gasosa

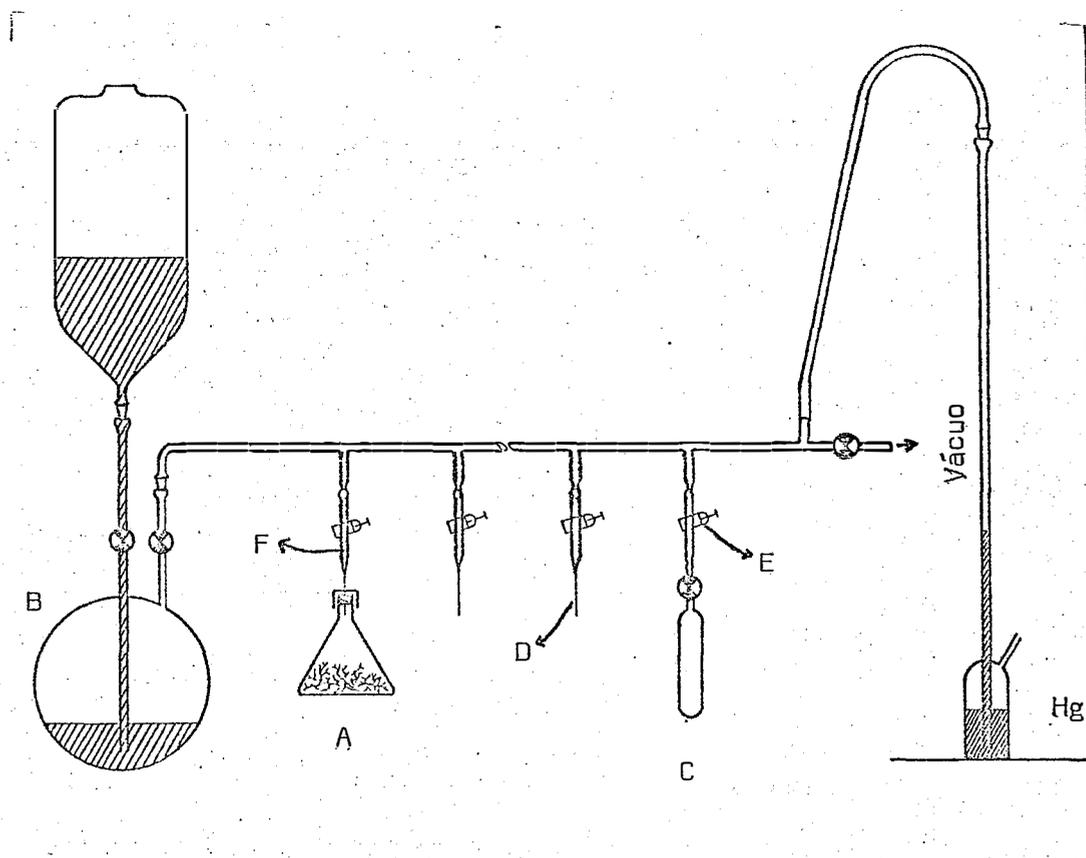


Figura 12 - Arranjo experimental utilizado para testes de fixação em raízes noduladas.

- A - Erlemeyer contendo raízes noduladas.
- B - Balão contendo a mistura gasosa.
- C - Balão de amostragem.
- D - Agulha hipodérmica.
- E - Pinças de Mohr.
- F - Tubos de látex.

Após 12 horas de incubação a 28^oC as amostras foram secadas em estufa a vácuo, moídas e preparadas para análise. O preparo das amostras está descrito em 3.2.6.1.. Em alguns casos as folhas e caules também serviram como testemunha.

3.2.4. Testes de fixação em planta inteira

As plantas de sacos plásticos, com mais ou menos 30 dias de idade, foram colocadas dentro de uma câmara e expostas à mistura gasosa por um certo período de tempo. O sistema utilizado está esquematizado na Figura 13. Um esquema detalhado da câmara é mostrado na Figura 14.

As plantas permaneciam num período luminoso de 16 horas por dia; as 8 horas restantes elas permaneciam no escuro. A luz foi fornecida pela bateria de lâmpadas (1) que continha 4 lâmpadas frias de 20w e 4 lâmpadas de tungstênio de 100w cada. A tampa superior da câmara é feita de lucite e verificou-se que tal material não barra as principais faixas de comprimento de onda da luz importantes para a fotossíntese. A energia fornecida pelas lâmpadas, medida com um fotômetro, verificou-se ser aproximadamente igual a 10-13% da energia solar incidente ao nível do solo, em um dia de céu limpo do mes de outubro. A distribuição espectral do conjunto de luzes é semelhante a da luz solar, diferindo apenas na região do vermelho distante, que é maior para aquelas.

Depois de feito vácuo no sistema a mistura gasosa foi transferida de um reservatório de 12 l para a câmara (2) com o auxílio de uma bomba "Toepler". Deve-se tomar o cuidado de colocar-se um "trap" mergulhado em gelo seco, na linha de transferência, para que se evite a passagem de vapor de mercúrio da bomba "Toepler" para a câmara, o que poderia ser prejudicial às plantas. A mistura gasosa foi admitida até que o manômetro (3) indicasse uma pressão ligeiramente inferior à pressão atmosférica.

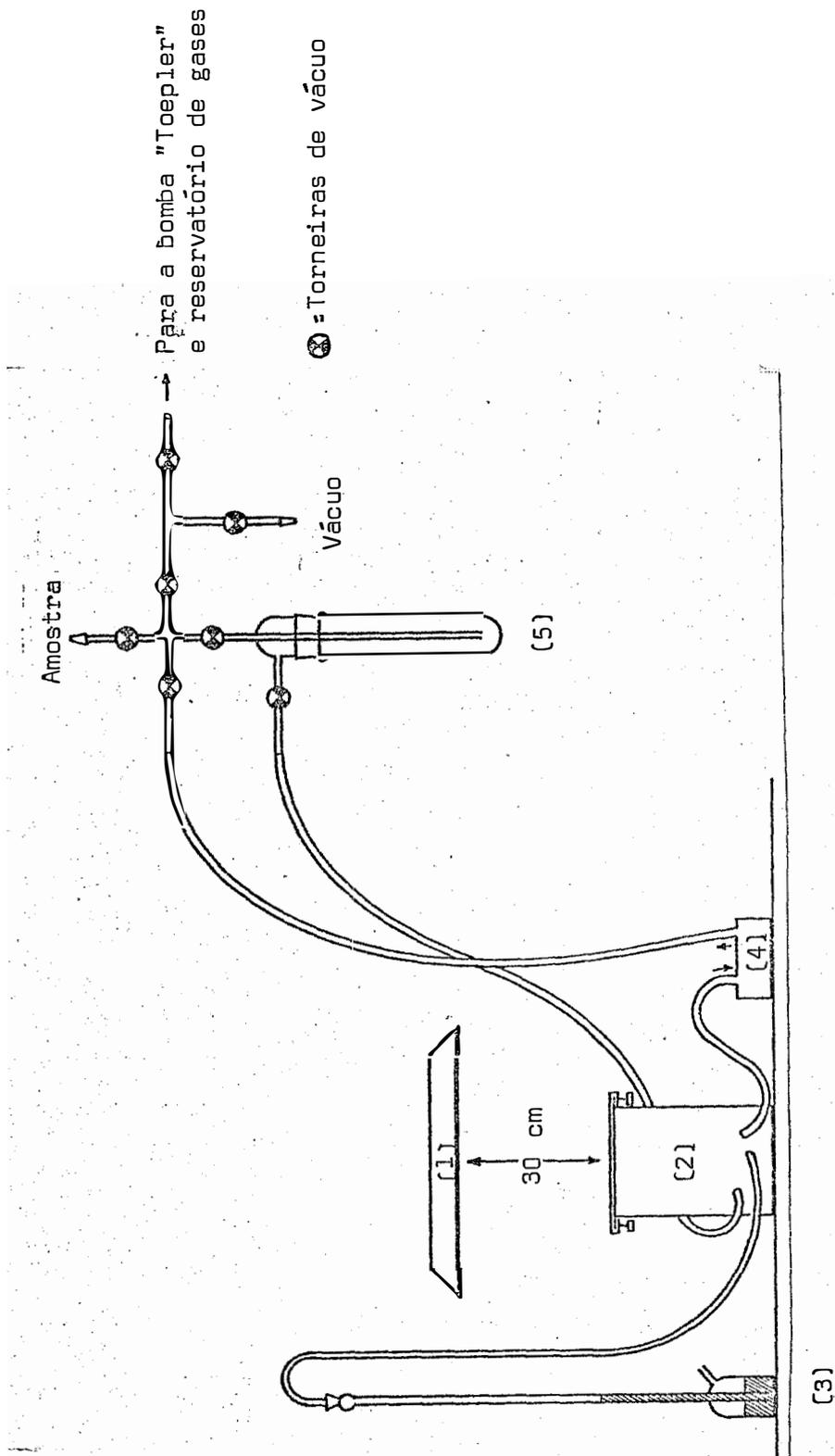


Figura 13 - Arranjo experimental utilizado para testes de fixação em plantas inteiras.

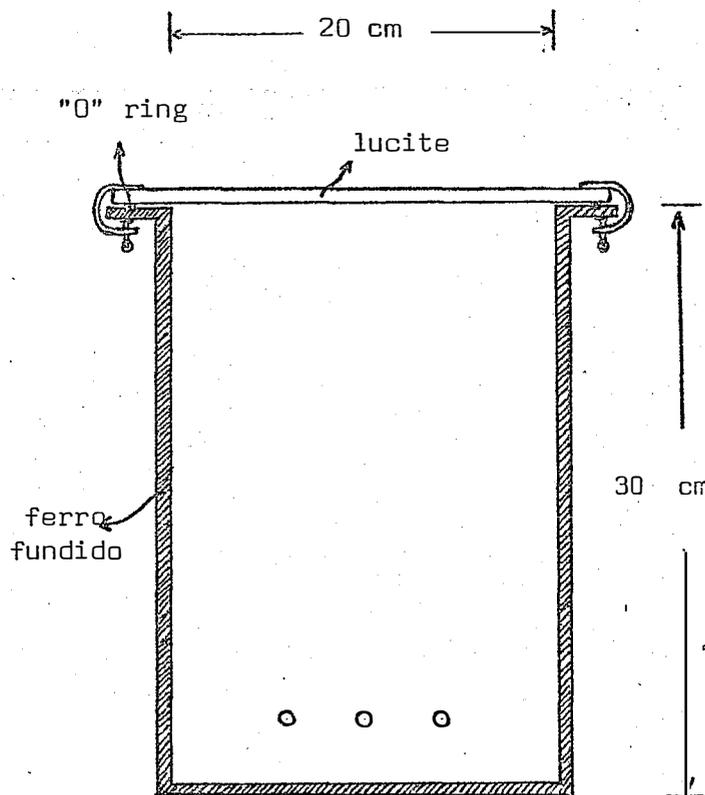


Figura 14 - Esquema da câmara utilizada

Em seguida inicia-se a circulação da mistura gasosa no sistema, com o auxílio da bomba de diafragma (4); a mistura gasosa permanece em circulação durante todo o experimento, exceto no momento em que se procede a retirada de amostras para verificação da composição e da concentração em ^{15}N da mesma; a quantidade de CO_2 poderá ser corrigida, caso necessário, condensando-o com nitrogênio líquido no "trap" (5), sendo o condensado eliminado através de vácuo. O "trap" (5) permanece, durante a maior parte do experimento, imerso em água gelada, condensando o vapor d'água da mistura gasosa a fim de que a atmosfera no interior da câmara não permaneça saturada.

Ao fim do experimento a mistura gasosa é devolvida ao reservatório com o auxílio de uma bomba "Toeppler" tomando-se novamente o cuidado de colocar-se um "trap" imerso em gelo seco na linha para evitar a passagem de umidade para o reservatório.

As plantas são então retiradas da câmara, separadas em parte aérea e raiz e postas a secar em estufa a vácuo. Depois de secas são moídas e preparadas para análise.

Deve-se tomar muito cuidado com a operação do sistema descrito acima, para evitar contaminações da mistura gasosa.

Como testemunha foram utilizados 2 tipos de plantas:

- a. plantas com raízes não noduladas colocadas nas mesmas condições que uma nodulada, no interior da câmara.
- b. plantas noduladas ou não, que permaneceram em atmosfera normal.

3.2.5. Coleta de N_2 atmosférico

Com o intuito de calibrar o gás N_2 de referência utilizado, em relação ao N_2 atmosférico, procedeu-se a coleta do mesmo. O principal problema que aparece em tal coleta é a remoção do oxigênio e do CO_2 da amostra, que poderão interferir na análise isotópica.

Dois métodos foram utilizados; assim, além da calibração do padrão utilizado, pode ser feita uma comparação entre a validade dos mesmos.

3.2.5.1. Oxidação de cobre metálico

O cobre metálico, quando na faixa de temperatura de 250 a 500°C, e na presença de O₂, é rapidamente oxidado a CuO (BERGERSEN, 1973).

HOERING (1955; 1956) e HOERING & MOORE (1958) se utilizaram de tal método para purificar N₂ atmosférico e declararam ser um método não isotopicamente fracionante. Utilizaram o gás purificado como padrão em suas análises. Tal gás, quando comparado com o padrão do "Bureau of Standards Isotope Reference", mostrou um erro da ordem de 0,2⁰/oo.

O sistema para purificação de N₂ atmosférico aqui utilizado é indicado na Figura 15.

Tal sistema foi construído originalmente para preparar amostras de carbono para análise isotópica de ¹³C. Foi modificado para se prestar à purificação de N₂ atmosférico com a adição do "trap" A. Este "trap" contém em seu interior limalha de cobre metálico, ficando durante o processo no interior de um forno (1) cuja temperatura pode chegar até 500°C. O vácuo do sistema é conseguido com o auxílio de uma bomba de difusão a óleo (2) em série com uma bomba rotativa (3). O ar a ser purificado é admitido em B. A bomba "Toeppler" (4) promove a circulação do ar pelo sistema, e conseqüentemente pelo cobre metálico aquecido, que é rapidamente oxidado pelo oxigênio do ar. O "trap" D permanece mergulhado em nitrogênio líquido para haver condensação do CO₂ do ar. Deixa-se em circulação por cerca de meia hora para garantir total absorção do O₂ e do CO₂. A amostra purificada é então retirada em C e levada para análise.

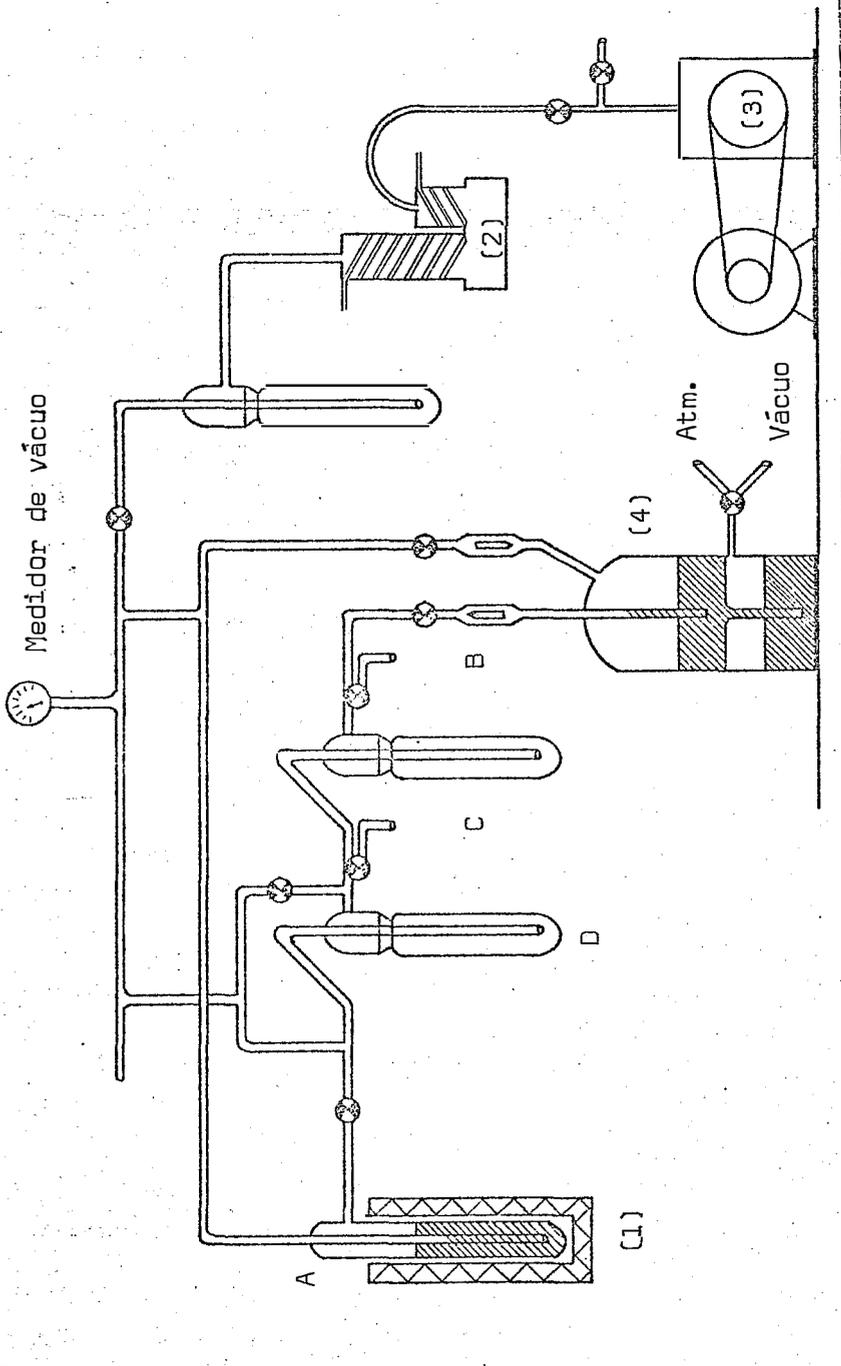


Figura 15 - Sistema utilizado para purificação de N_2 atmosférico através da oxidação de Cu metálico.

3.2.5.2. Absorção de O_2 por solução de pirogalol

Existem diversas soluções descritas na literatura capazes de absorver O_2 . Assim, *JUNK & SVEC (1958)* se utilizaram de uma solução de ditonito de sódio e antraquinona sulfonato de sódio, conhecida como solução de Fieser, para absorção de O_2 do ar atmosférico.

PARWEL et alii (1957) utilizaram uma solução de pirogalol para absorver O_2 do ar atmosférico. Os traços remanescentes eram retirados por tratamento com fósforo branco.

O pirogalol (1, 2, 3 benzenotriol - $C_6H_3(OH)_3$) foi por nós escolhido por ser um composto mais facilmente encontrado no comércio. A composição da solução é a seguinte (retirada do Handbook of Physics and Chemistry):

120 g de KOH
5 g de pirogalol
100 ml de água

A solução, por ser fortemente alcalina, garante a absorção do CO_2 atmosférico também.

Cerca de 20 ml desta solução foram colocados em um tubo, num ambiente aberto. O tubo foi fechado e em seguida agitado durante u ma hora. A amostra foi então transferida para um balão, como mostra a Figura 16 e levada para análise. Tomou-se o cuidado de fazer o congelamento da amostra em nitrogênio líquido para evitar a entra da de vapor d'água no espectrômetro.

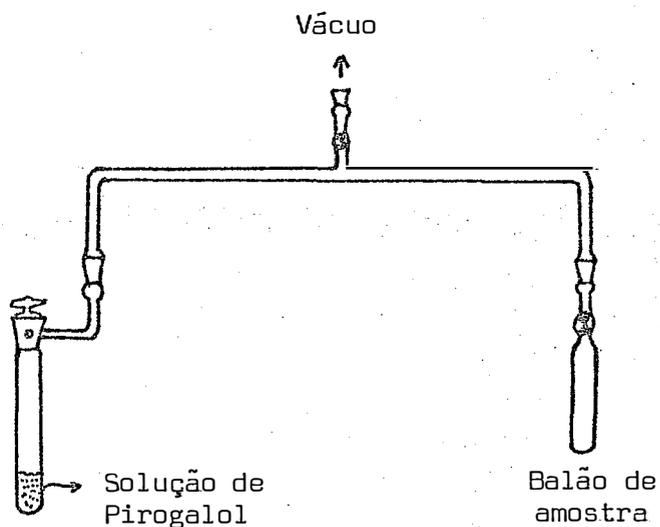


Figura 16 - Arranjo experimental utilizado para transferência da amostra

3.2.6. Preparo das amostras

Dois foram os métodos aqui empregados para o preparo das amostras para análise isotópica de N_2 : o método de Dumas modificado e o método de oxidação da amônia por hipobromito de sódio.

3.2.6.1. Método de Dumas modificado

É uma modificação do método de Dumas. No método original o N_2 liberado pela combustão de uma amostra em presença de CuO é coletado em um nitrômetro.

PROKSCH (1969) e *FIEDLER & PROKSCH (1972)* utilizaram o método de Dumas modificado obtendo bons resultados. Tal método foi descrito por *TRIVELIN et alii (1973)*. Possui a vantagem de converter diretamente N combinado em N_2 .

O material a ser analisado, depois de seco e pulverizado, é pesado em quantidades de acordo com o tipo de análise isotópica desejada. É em seguida colocado em tubos especiais de vidro pirex (Figura 17a.) juntamente com quantidades determinadas de CuO e CaO; a proporção é a seguinte: para cada 100 mg de amostra juntam-se 1,5 g de CuO e 1,5 g de CaO. O óxido de cálcio, antes de ser utilizado, deve ser aquecido a 1000°C durante cerca de uma hora, para que ocorra total recuperação do CaO (PROKSCH, 1969). Os tubos são então levados a um sistema onde são evacuados até uma pressão residual da ordem de 5×10^{-3} mm de Hg. O sistema de vácuo aqui utilizado permite o manuseio de 12 amostras simultaneamente. Após atingido o vácuo desejado os tubos são fechados na região do estrangulamento indicada na Figura 17a. com o auxílio de um maçarico. A Figura 17b. mostra como ficará o tubo após esta operação.

Os tubos fechados são em seguida levados a combustão em um forno de temperatura controlada, obedecendo-se ao seguinte critério para o aquecimento (Quadro II), por causa do rápido aumento de temperatura do forno.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)
200	1
250	0,25
300	0,25
350	0,25
400	0,25
450	0,25
500	0,25
550	8

Quadro II - Critério estabelecido para aquecimento e combustão da amostra pelo método de Dumas modificado.

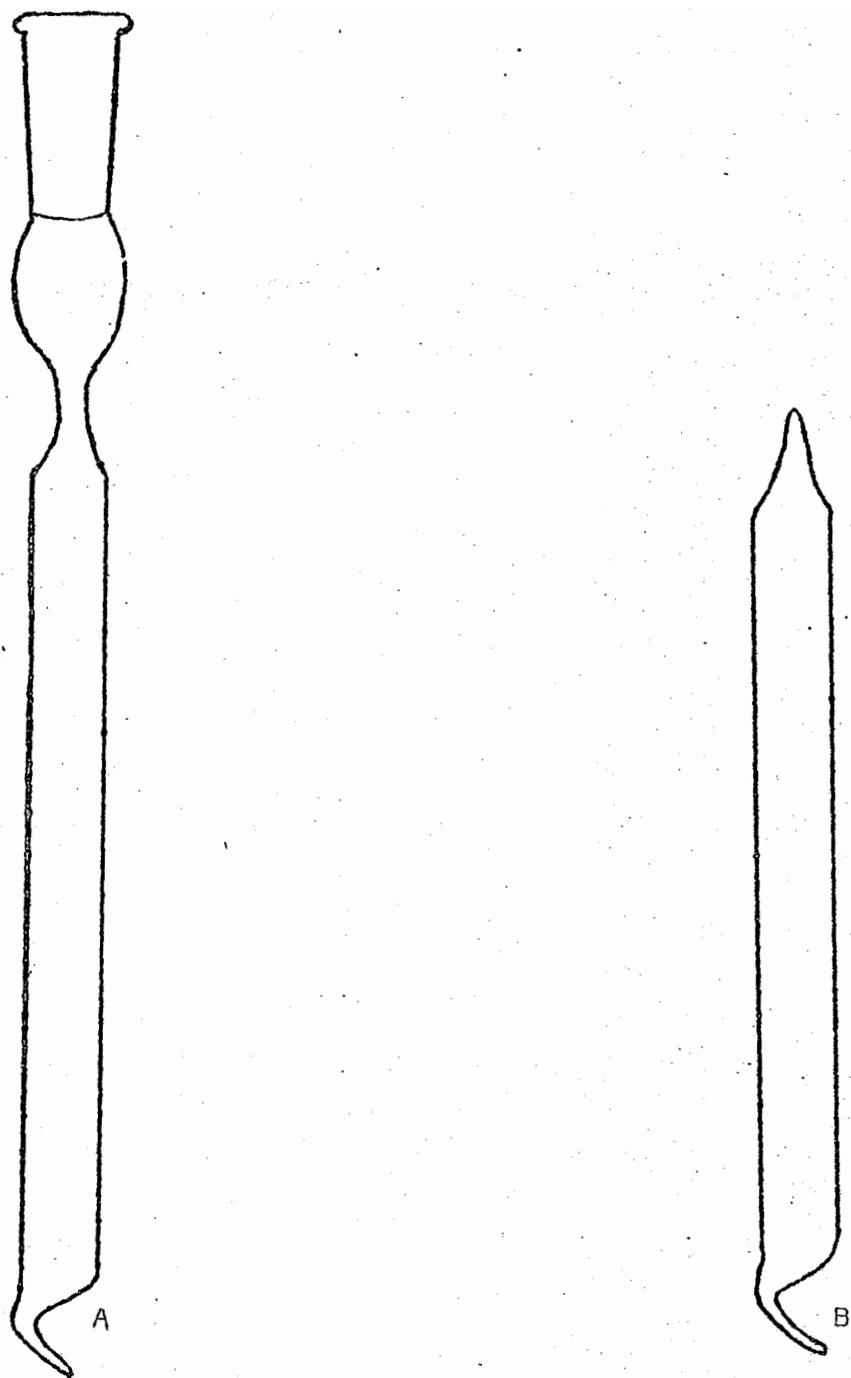


Figura 17 ~ Tubos de vidro utilizados no preparo de amostras pelo método de Dumas modificado.

Os tubos de amostra, após resfriamento, são colocados em tubos especiais (Figura 18), que são evacuados até 5×10^{-3} mm de Hg para eliminação do ar em seu interior. O N_2 contido no tubo de amostra passa para o tubo da Figura 18 pela quebra de sua extremidade inferior, construída especialmente para este fim.

A linha de vácuo utilizada é mostrada esquematicamente na Figura 19.

O principal problema que pode ocorrer neste método é a combustão incompleta da amostra que pode levar ao aparecimento de metano e oxigênio no gás liberado (FIEDLER & PROKSCH, 1972).

3.2.6.2. Método de oxidação da amônia por hipobromito de sódio

O método em questão envolve duas etapas:

- a. conversão de N combinado para amônia, feito pelo método de Kjeldahl.
- b. conversão da amônia para N_2 através de oxidação com hipobromito de sódio.

O método foi desenvolvido originalmente por RITTENBERG (1946), sofrendo depois diversas modificações, sempre com o intuito de melhorá-lo. O método aqui utilizado é o descrito por BREMNER (1965).

- a. Conversão do N combinado em amônia - utiliza-se o método de Kjeldahl ou uma de suas modificações. A matéria seca (amostra), depois de moída e pesada numa quantidade suficiente para se conseguir a quantidade de gás necessária para análise é colocada em um balão de Kjeldahl, juntamente com cerca de 7 ml de uma solução digestora cuja composição é a seguinte:

175 ml de H_2O destilada
 3,6 g de Na_2SeO_3 (catalizador)
 4,0 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (catalizador)
 48,5 g de K_2SO_4
 200 ml de H_2SO_4 concentrado

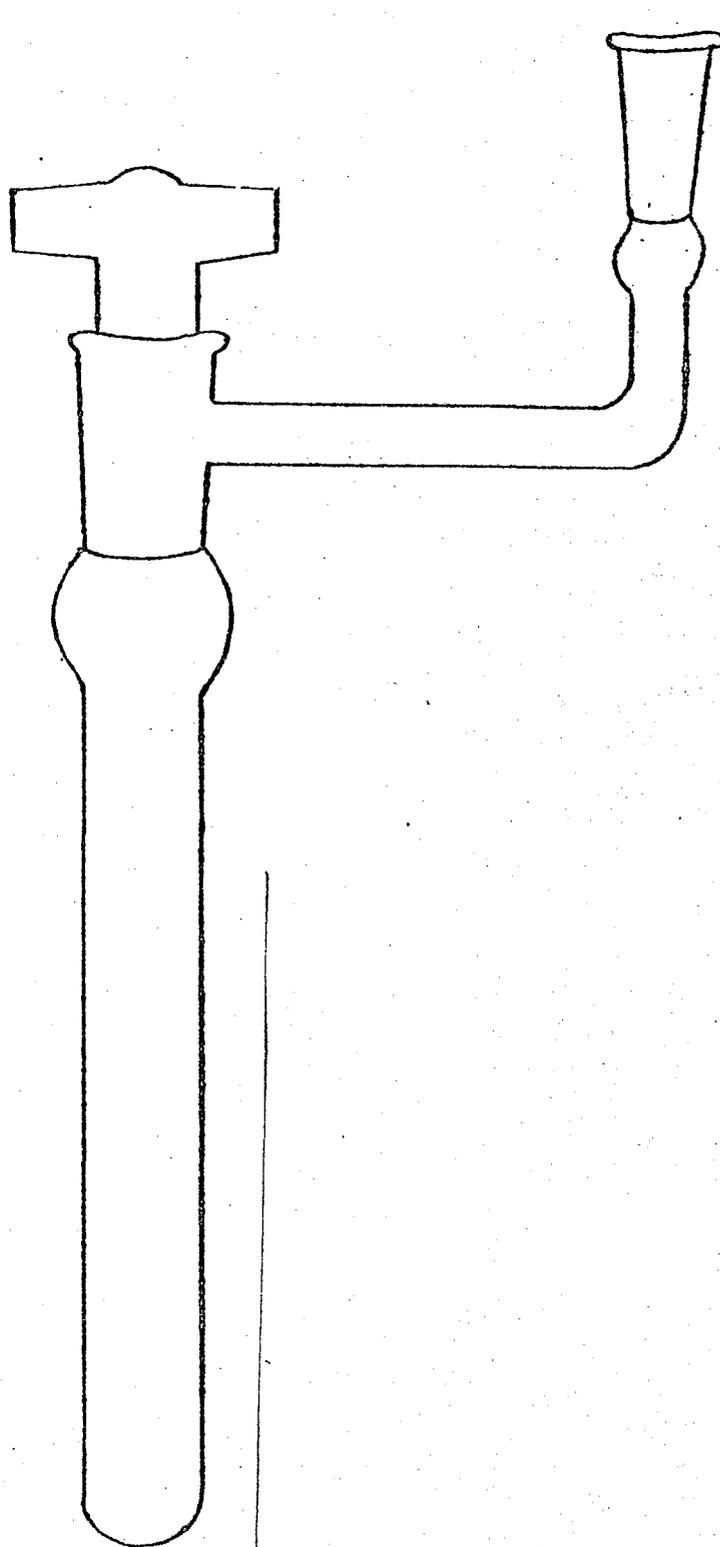
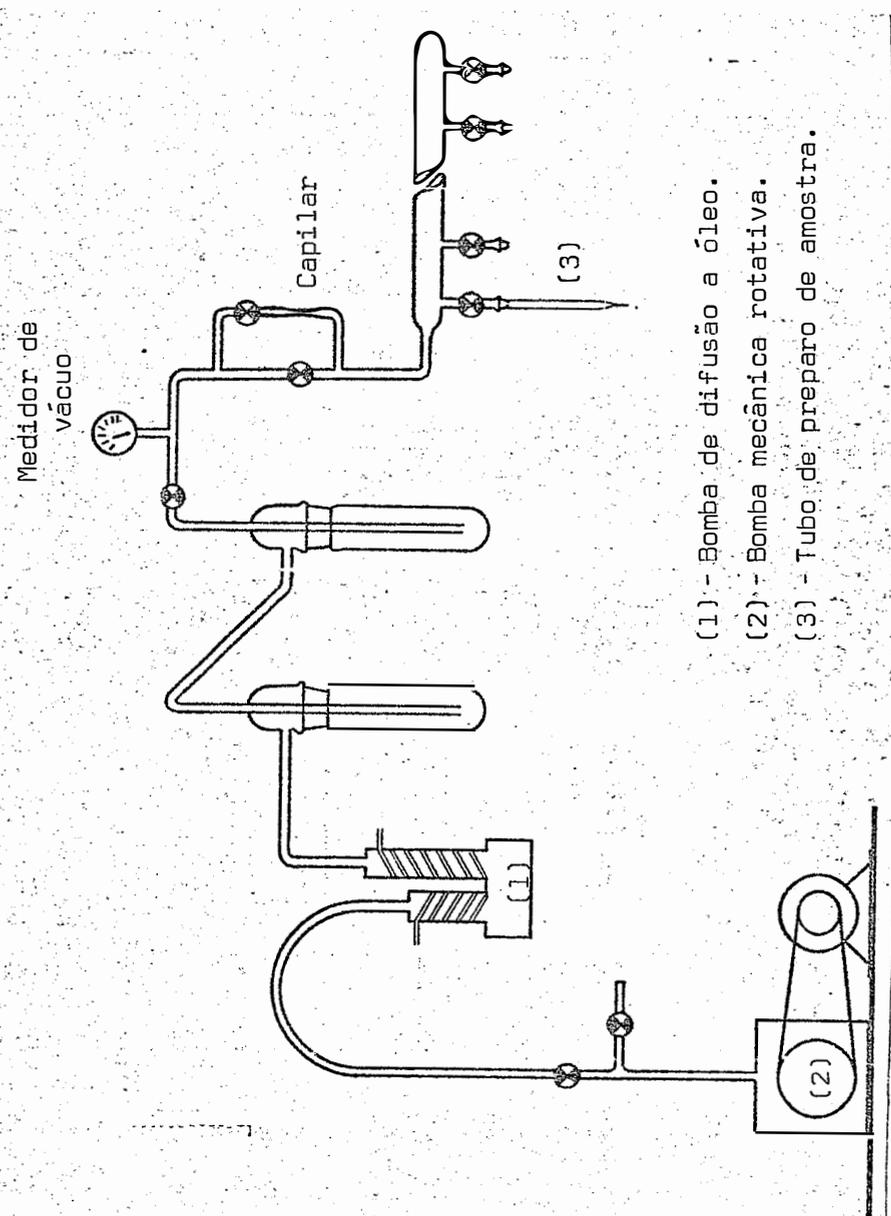


Figura 18 - Tubos utilizados para expansão do gás obtido na combustão de Dumas.



- (1) - Bomba de difusão a óleo.
- (2) - Bomba mecânica rotativa.
- (3) - Tubo de preparo de amostra.

Figura 19 - Sistema de vácuo utilizado no preparo de amostras.

A amostra é digerida a quente (cerca de 300°C) por um tempo de 16-20 horas. Para tempos menores que estes o digerido pode conter impurezas voláteis que serão carregadas juntamente com o NH_3 na destilação e contaminarão o N_2 liberado na reação de oxidação. Estas impurezas poderão originar íons de massa 29 e/ou 31 (metilamina) e 45 (etilamina e dietilamina) que poderão influenciar erroneamente o resultado das medidas isotópicas de N_2 (RITTENBERG, 1946).

Durante a digestão o nitrogênio combinado é transformado em amônia. Caso o material em estudo contenha nitrato, este não será transformado em amônia; para que tal aconteça é necessário que seja feito um pré-tratamento da amostra com ácido salicílico e tiosulfato (BREMNER, 1965).

Em seguida, o digerido é tratado com álcali, no caso soda 18N, havendo liberação de NH_3 que é destilado por arrastamento com vapor d'água e recebido em uma solução de ácido sulfúrico 0,05N. Sempre se utiliza ácido em excesso para garantir total absorção do NH_3 e fornecer um meio ácido no qual o sal amoniacal formado é estável.

A solução de sal amoniacal assim formada, depois de sofrer evaporação para redução de seu volume, passa para a etapa seguinte que é a oxidação da amônia pelo hipobromito de sódio.

- b. Conversão da amônia para N_2 - O princípio básico de tal processo está descrito em 3.2.2. (equação 2), assim como os problemas que poderão surgir.

A amostra e o hipobromito são colocados no tubo de Rittenberg (Figura 20) em ramos separados. O tubo é evacuado para que se eliminem o ar do seu interior e os gases dissolvidos na amostra e no reagente. Feito o vácuo, a amostra é posta em contato com o hipobromito, pela simples inclinação do tubo, havendo liberação de N_2 , que é levado para análise. Deve-se tomar o cuidado de, antes de se admitir o gás no espectrômetro, fazer um congelamento

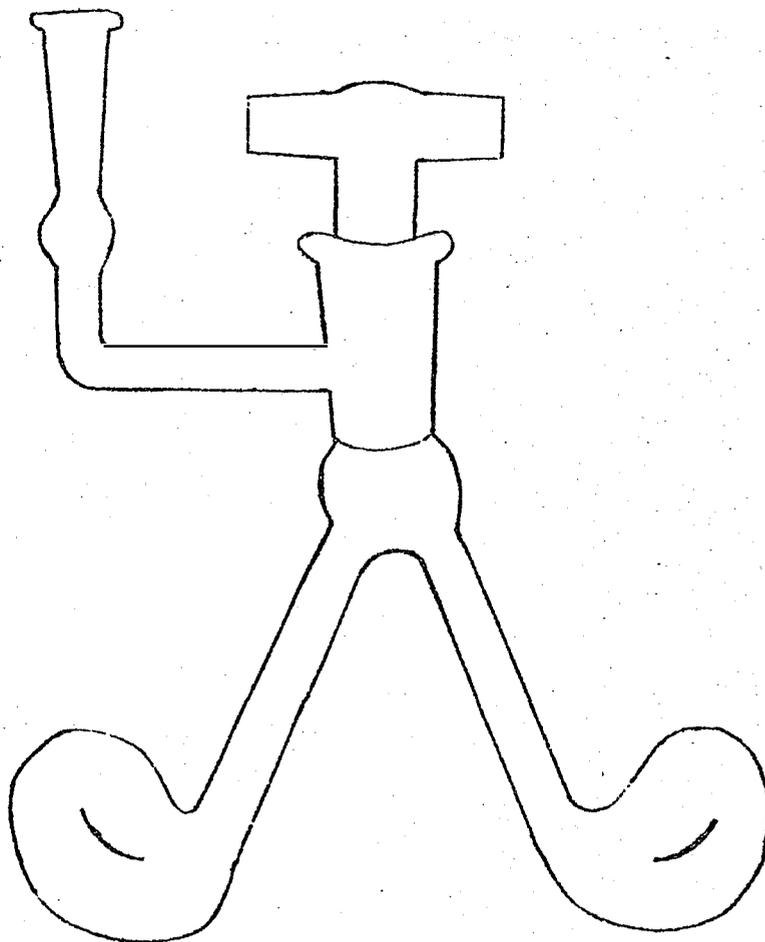


Figura 20 - Tubo de Rittenberg utilizado no preparo de a mostras pelo método de oxidação da amônia pelo hipobromito de sódio.

mento do tubo de reação em nitrogênio líquido, evitando assim a entrada de vapores de água e/ou bromo no aparelho.

3.2.7. Análise das amostras

As análises foram analisadas no espectrômetro de massa por 2 métodos: utilizando coletor simples e utilizando coletor duplo.

3.2.7.1. Análise isotópica utilizando coletor simples

Neste tipo de análise, o gás a ser analisado é introduzido na câmara de ionização do espectrômetro de massa através do sistema de admissão de fluxo molecular. Na câmara de ionização são formados vários íons, dos quais nos interessa a medida dos de número de massa 28, 29 e 30, para cálculo da concentração em ^{15}N da amostra, e os de número de massa 32 ou 40, para sabermos se a amostra foi contaminada pelo ar atmosférico. Neste caso, o feixe de íons é detectado por um único coletor, amplificado e medido através de um registrador.

Variando-se a intensidade do campo magnético analisador con segue-se que íons de diferentes massas penetrem no coletor e sejam registrados em forma de picos, fornecendo um gráfico que chamamos espectro de massas.

Ao produto da altura em mm de um pico pela sensibilidade do registrador em volts, denominamos intensidade do pico. O cálculo da concentração em ^{15}N de uma amostra baseia-se na medida da intensidade dos picos, como veremos adiante.

Cumpra aqui dizer que antes de se proceder a análise é necessário que seja determinado o "background" do aparelho, ou seja, é necessário que seja feita uma varredura dos picos de interesse, sem que seja admitido gás na câmara de ionização. Do valor da intensidade do pico na amostra deverá ser descontado o valor da intensidade do pico correspondente no "background".

A concentração em átomos % de ^{15}N em uma amostra é definida por:

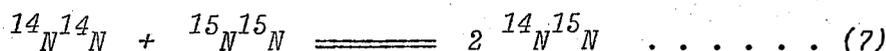
$$A\%^{15}\text{N} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de átomos de } ^{15}\text{N}}{\text{n}^\circ \text{ de átomos de } ^{14}\text{N} + \text{n}^\circ \text{ de átomos de } ^{15}\text{N}} \times 100 \dots (4)$$

$$A\%^{15}\text{N} = \frac{[^{14}\text{N}^{15}\text{N}] + 2 [^{15}\text{N}^{15}\text{N}]}{2 [^{14}\text{N}^{14}\text{N}] + 2 [^{15}\text{N}^{14}\text{N}] + 2 [^{15}\text{N}^{15}\text{N}]} \times 100 \dots (5)$$

ou ainda:

$$A\%^{15}\text{N} = \frac{I_{29} + 2 I_{30}}{2(I_{28} + I_{29} + I_{30})} \times 100 \dots (6)$$

Para uma amostra de baixa concentração em ^{15}N , a seguinte reação de equilíbrio torna-se importante (RITTENBERG, 1946):



onde a constante de equilíbrio à temperatura ambiente tem valor aproximadamente igual a 4.

$$K = \frac{[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]^2}{[^{14}\text{N}^{14}\text{N}] [^{15}\text{N}^{15}\text{N}]} = 4 \dots (8)$$

A partir das equações (5) e (8) consegue-se demonstrar que:

$$A\%^{15}N = \frac{100}{2 \frac{\left[\frac{I_{28}^{14}N}{I_{29}^{14}N} \right]}{\left[\frac{I_{28}^{14}N}{I_{29}^{15}N} \right]} + 1} \dots \dots \dots (9)$$

ou

$$A\%^{15}N = \frac{100}{2 \frac{I_{28}}{I_{29}} + 1} \dots \dots \dots (10)$$

ou ainda:

$$A\%^{15}N = \frac{100}{2R + 1} \dots \dots \dots (11)$$

Desta maneira, para amostras com baixa concentração em ¹⁵N, não há necessidade de se medir o pico 30.

Como foi dito anteriormente, os picos 32 ou 40 são medidos para sabermos se houve contaminação da amostra pelo ar atmosférico. Esta contaminação poderá levar a erros no valor determinado.

Caso a amostra esteja contaminada é necessário que seja feita uma correção. Ela é feita baseando-se na concentração de N₂, O₂ e A_r do ar atmosférico.

Depois de levada em conta a contaminação, a equação (9) fica:

$$A\%^{15}N = \frac{100}{2 \left[\frac{(I_{28})_{am} + Cont. - \frac{(I_{28})_{ar}}{(I_{32})_{ar}} \times (I_{32})_{Cont.}}{(I_{29})_{am} + Cont. - \frac{(I_{29})_{ar}}{(I_{32})_{ar}} \times (I_{32})_{Cont.}} \right] + 1} \dots (12)$$

onde:

$(I_{28})_{am} + Cont.$ = intensidade do pico 28 devido a amostra + contaminação

$(I_{29})_{am} + Cont.$ = intensidade do pico 29 devido a amostra + contaminação

$\frac{(I_{28})_{ar}}{(I_{32})_{ar}}$ = relação entre as intensidades dos picos 28 e 32 para o ar atmosférico. Esta relação é constante.

$(I_{32})_{Cont.}$ = intensidade do pico 32 devido a contaminação.

Da mesma maneira a equação (6) fica:

$$A\%^{15}N = \frac{\left[(I_{29})_{am} + Cont. - \frac{(I_{29})_{ar}}{(I_{32})_{ar}} (I_{32})_{Cont.} \right] + 2 \left\{ (I_{28})_{am} + Cont. - \frac{(I_{28})_{ar}}{(I_{32})_{ar}} (I_{32})_{Cont.} \right\} + 2 \left[(I_{30})_{am} \right]}{\left[(I_{29})_{am} + Cont. - \frac{(I_{29})_{ar}}{(I_{32})_{ar}} (I_{32})_{Cont.} \right] + \left[(I_{30})_{am} \right]} \times 100 \dots \dots \dots (13)$$

Em ambos os casos a correção foi feita pela massa 32. Nos casos de amostras preparadas pelo método de oxidação por hipobromito de sódio, em que não se tem certeza se o oxigênio presente é devido à contaminação pelo ar atmosférico ou se foi liberado pelo hipobromito, a correção deverá ser feita baseando-se no pico 40.

Este tipo de análise foi utilizado para se determinar a per

centagem de ^{15}N nas misturas gasosas utilizadas nos diversos experimentos realizados, bem como para determinar a concentração percentual de cada componente gasoso nas citadas misturas.

Para o cálculo da concentração percentual de cada componente gasoso na mistura, é necessário que se leve em conta a diferente sensibilidade do espectrômetro de massa para cada espécie molecular. Analisando-se amostras de composição conhecida, calculam-se fatores de correção que deverão ser multiplicados pelos resultados obtidos para a composição da amostra em estudo, obtendo-se assim a porcentagem real de cada componente na amostra. Os fatores de correção calculados por CAMARGO (1971) e por nós utilizados são os seguintes:

N_2	0,980
O_2	1,100
A_r	0,950
CO_2	0,995

3.2.7.2. Análise isotópica utilizando duplo coletor

Este tipo de análise geralmente é utilizado:

- na determinação da variação da razão natural dos isótopos de nitrogênio de massas 14 e 15.
- em trabalhos utilizando ^{15}N como traçador, porém com baixas concentrações.
- em trabalhos utilizando ^{15}N como traçador, porém com um fator de diluição isotópica muito grande (TRIVELIN *et alii*, 1973).

Neste método os resultados são dados em $\delta^{15}\text{N}^0/\text{oo}$, cujo significado veremos adiante.

A medida da variação da relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ é feita pelo método do ponto nulo (McKINNEY *et alii*, 1950). Os íons de número de massa

28 e 29 são coletados simultaneamente em coletores separados. As correntes são ampliadas independentemente, e uma fração do sinal correspondente ao íon mais abundante (U_B), de massa 28, é utilizada para anular o sinal produzido pelos íons menos abundantes (U_A), de massa 29, conforme mostra a Figura 21 (VIEIRA, 1974).

A diferença $U_A - pU_B$ é medida e registrada (Gráfico 1). Como se utiliza o método de ponto nulo, teremos:

$$U_A - pU_B = 0$$

ou

$$p = \frac{U_A}{U_B} \dots \dots \dots (14)$$

onde:

U_A = corrente de íons produzida pelo isótopo menos abundante

U_B = corrente de íons produzida pelo isótopo mais abundante

p = fator de resistência pelo qual a corrente de íons do isótopo mais abundante é multiplicada ($0 < p < 1$)

A análise é feita comparando-se a amostra em estudo com outra tomada como padrão. A amostra e o padrão são admitidos alternadamente na câmara de ionização, utilizando-se o sistema de admissão de fluxo viscoso (Figura 6).

Com o padrão admitido faz-se um ajuste do potenciômetro variável (Figura 21) até que o traçado do registrador atinja um ponto mais próximo possível de um referencial, no caso o zero do amplificador A. Uma mudança de algumas unidades no potenciômetro provocará um desvio no gráfico, que servirá para determinação da sensibilidade da análise em $\text{mm/l}^0/\text{oo}$; anota-se no gráfico o novo número do potenciômetro (Gráfico 1, parte a).

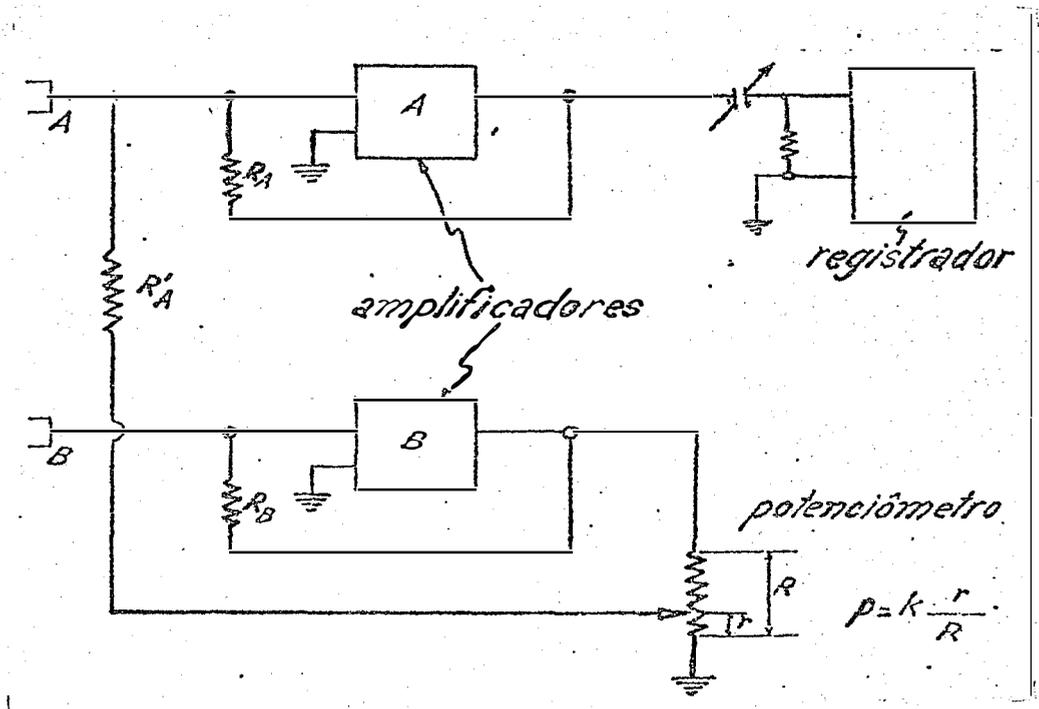


Figura 21 - Circuito de balanceamento para o método de ponto nulo.

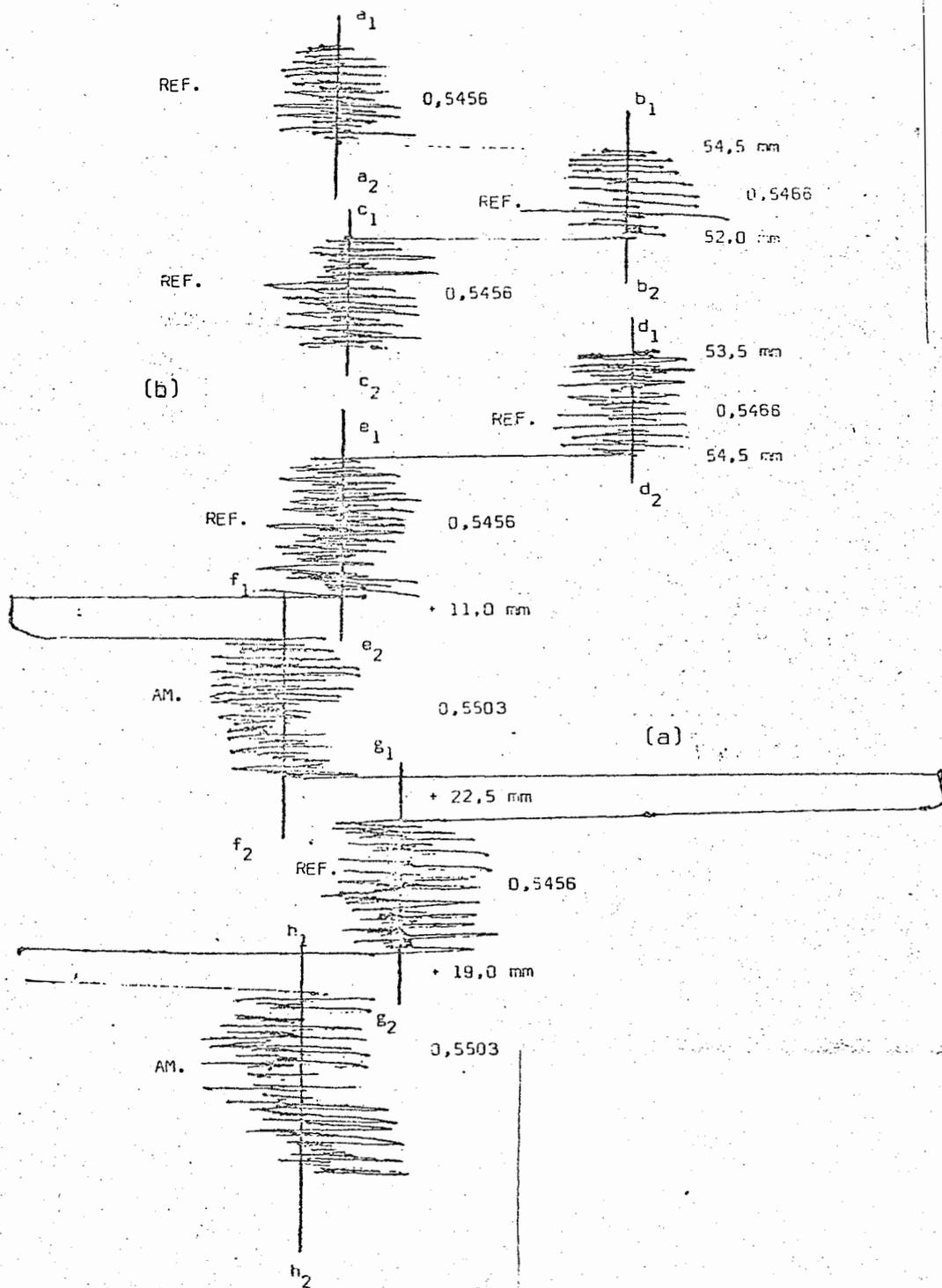


Gráfico 1 - Gráfico obtido em uma análise feita pelo método de duplo coletor.

Em seguida, admite-se a amostra ajustando-se o potenciômetro para que o traçado no gráfico fique o mais próximo possível ao traçado obtido anteriormente para a referência (padrão); anota-se o número do potenciômetro. Admite-se o padrão e a amostra alternadamente por 3 ou 4 vezes (Gráfico 1, parte b).

Para o cálculo do $\delta^0/00$ medem-se as distâncias conforme indicado no Gráfico 1 e tira-se a média aritmética dos valores correspondentes à análise propriamente dita e à determinação da sensibilidade de análise.

$$\Delta_s = \frac{ba + bc + dc + de}{4} \dots \dots \dots (15)$$

$$\Delta_m = \frac{e^0 + gf + gh}{3} \dots \dots \dots (16)$$

onde:

Δ_s = média de valores a ser utilizada para cálculo da sensibilidade de análise.

Δ_m = média de valores a ser utilizada para correção do $\delta^0/00$ obtido

No caso do Gráfico 1, teremos:

$$\Delta_s = \frac{54,5 + 52,0 + 53,5 + 54,5}{4} = 53,62 \text{ mm}$$

$$\Delta_m = \frac{11 + 22,5 + 19}{3} = 17,5 \text{ mm}$$

Para o cálculo da sensibilidade de análise, com os valores 0,5456 e 0,5466 do potenciômetro, obtém-se um deslocamento médio de 53,62 mm no gráfico (Gráfico 1a.). Então teremos:

$$\delta^0/00 = \frac{0,5466 - 0,5456}{0,5456} \times 100$$

$$\delta^0/00 = 1,83^0/00$$

Podemos agora calibrar a escala do papel registrador; o valor acima obtido indica que um deslocamento de 53,62 mm no gráfico de registro corresponde a uma variação de 1,83⁰/00 na razão isotópica. Então, para uma variação de 1⁰/00, teremos:

$$s = \frac{\Delta s \text{ (mm)}}{^0/00} = \frac{53,62}{1,83} = 29,25 \text{ mm}/1^0/00 \dots \dots (17)$$

O valor obtido em (17) significa que, para um mesmo número do potenciômetro, um desvio de 29,25 mm da amostra em relação ao padrão é equivalente a um desvio de 1⁰/00 entre as mesmas.

O valor do $\delta^{15}N^0/00$ de uma amostra em relação a uma referência é dado por:

$$\delta^{15}N^0/00 = \frac{\left[\frac{^{14}N^{15}N}{^{14}N^{14}N} \right]_{am} - \left[\frac{^{14}N^{15}N}{^{14}N^{14}N} \right]_{ref.}}{\left[\frac{^{14}N^{15}N}{^{14}N^{14}N} \right]_{ref.}} \times 1000 \dots \dots (18)$$

ou

$$\delta^{15}N^0/00 = \frac{R_{am} - R_{ref.}}{R_{ref.}} \times 1000 \dots \dots \dots (19)$$

onde R_{am} e R_{ref} são os valores obtidos no potenciômetro de ajuste para a amostra e referência respectivamente.

A equação 19 poderia ser usada diretamente caso os traçados dos gráficos para amostra e referência ficassem numa mesma linha. Como o que geralmente se obtém são desvios da amostra para a direita ou para a esquerda da referência, deverá ser feita uma correção da equação (19) para obtenção do $\delta^{15}N/100$ real da amostra. Os desvios para a esquerda da referência correspondem a valores positivos, e para aqueles à direita, a valores negativos.

O termo de correção que deverá ser somado algebricamente à equação (19) é dado por:

$$\delta i = \frac{\Delta m}{S} (^\circ/100) \dots \dots \dots (20)$$

onde:

Δm = valor absoluto da média aritmética dos desvios da amostra em relação à referência.

S = sensibilidade

Então a equação (19) fica:

$$\delta^{15}N/100 = \frac{R_{am} - R_{ref}}{R_{ref}} \times 1000 + \delta i \dots \dots \dots (21)$$

Para nosso exemplo, temos:

$$\delta i = \frac{17,50}{29,25} = 0,598$$

Substituindo os valores encontrados na equação (21), teremos:

$$\delta^{15}\text{N}^{\text{O}}/\text{OO} = \frac{0,5503 - 0,5456}{0,5456} \times 1000 + 0,598$$

$$\delta^{15}\text{N}^{\text{O}}/\text{OO} = + 9,21$$

Este valor representa quantos por mil a razão 29/28 de uma amostra difere, para mais ou para menos, da referência.

Por este método foram analisadas as amostras de material vegetal provenientes dos experimentos realizados.

3.2.8. Modificação introduzida no sistema de admissão de fluxo viscoso do espectrômetro

O método de análise utilizando duplo coletor exige que a pressão da amostra na câmara de ionização seja relativamente alta para que tenhamos uma boa sensibilidade de análise. *TRIVELIN et alii* (1973) apresentam os seguintes dados, relacionando pressão de amostra com sensibilidade de análise (Quadro III)

Vol. do balão cm ³	Pressão mm Hg	Sensibilidade mm/1 ⁰ /oo
54	70	21
32	114	27
54	107	27
32	180	43

Quadro III - Sensibilidade de análise em função da pressão de amostra (*TRIVELIN et alii*, 1973).

Para evitar o processo de transferência de duas ou mais amostras para um só balão, descrito pelos autores acima citados, até

conseguir-se a pressão desejada, introduziu-se uma modificação no sistema de admissão do espectrômetro de massa. Tal modificação permite que se aumente a pressão de uma amostra, tornando desnecessária a junção de duas ou mais amostras e possibilitando, portanto, um maior número de repetições por amostras. Em alguns casos, porém, foi necessário que se juntassem 2 amostras, devido ao baixo teor de N total da mesma.

A modificação introduzida é apresentada esquematicamente na Figura 22.

A amostra ou referência é colocada em sua respectiva entrada. Como o sistema é simétrico, descreveremos as operações de funcionamento para o lado da amostra. Faz-se vácuo no sistema e a amostra é então expandida, abaixando-se totalmente a coluna de mercúrio da bomba "Toepler" manual (C). Isto se consegue fazendo-se vácuo no balão da bomba através da torneira (1). O volume da coluna de mercúrio é de cerca de 200 cm^3 , mais ou menos 4 vezes maior que o balão de expansão da amostra. Em seguida, fechando-se a torneira (2), abrindo-se a torneira (3), e com a torneira (1) aberta para a atmosfera, o gás é comprimido pela coluna de mercúrio. As esferas de aço (D) no interior das colunas de mercúrio evitam que haja passagem do mesmo para o sistema de admissão. O manômetro de mercúrio (E) se presta para a leitura de pressão da amostra. Desta maneira teremos um controle de pressão de amostra através da movimentação da coluna de mercúrio.

A medida da pressão do gás N_2 liberada por uma amostra preparada pelo método de Dumas poderá ser utilizada para o cálculo do teor de N total da mesma. Para isso é necessário que se conheça o volume do sistema de admissão no qual foi medida a pressão e que se tenha certeza de que a combustão da amostra foi completa, ou seja, todo o N_2 foi liberado. As impurezas gasosas da amostra devem ser reduzidas a quantidades desprezíveis. Uma vez medida a pressão, a

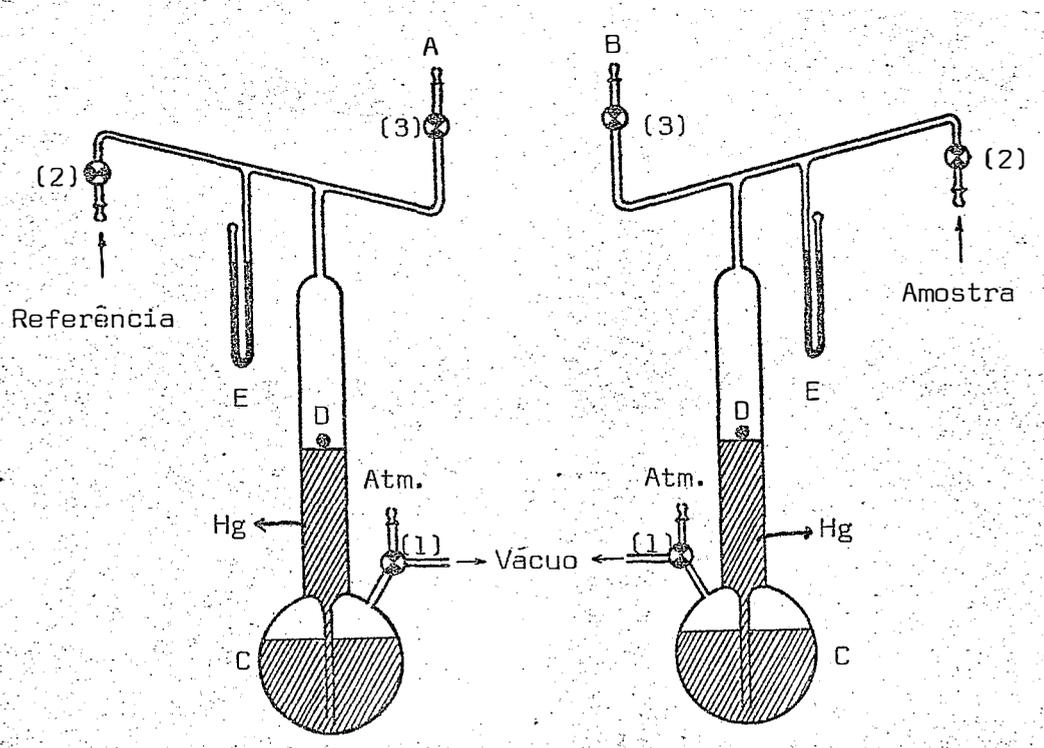


Figura 22 - Modificação introduzida no sistema de admissão de fluxo viscoso.

A e B - Entradas do sistema de admissão do espectrômetro.

C - Bomba "Toepler".

D - Esferas de aço.

E - Manômetro de mercúrio.

(1), (2) e (3) - Torneiras de vácuo.

percentagem de N na amostra é dada por *FIEDLER & PROKSCH (1972)*:

$$\%N = \frac{P \cdot V}{(273 + t) \cdot W} \cdot \frac{273 \cdot 28}{760 \cdot 22,4} \cdot 100 \dots \dots (22)$$

onde:

P = pressão da amostra no sistema de admissão (mm Hg)

V = volume do sistema de admissão mais tubo de expansão (ml)

t = temperatura ambiente (°C)

W = massa de amostra (mg)

O volume do sistema de admissão mais o tubo de expansão pode ser previamente determinado utilizando-se quantidades conhecidas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como amostra. O sulfato produz N_2 puro, quantitativamente, pelo método de Dumas, e a sua percentagem de N é conhecida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Precisão analítica das medidas efetuadas

Como a quantidade da maior parte das amostras analisadas não permitiu um número de repetições maior que 2, a precisão analítica foi determinada pela análise, em dias diferentes, de uma série de amostras tomada como contrôlo. O material escolhido foi o fruto de feijão da variedade carioca. Foram preparadas 26 amostras pelo método descrito em 3.2.6.1., e os resultados das análises são mostrados no Quadro IV.

Quadro IV - Resultado das análises de amostras de fruto de feijão da variedade Carioca.

Amostra	Dia da análise	$\delta^{15}N^o/oo$
1	20.09.74	+ 24,73
2	20.09.74	+ 24,31
3	03.10.74	+ 24,37
4	03.10.74	+ 24,25
5	03.10.74	+ 24,08
6	11.10.74	+ 23,75
7	28.10.74	+ 23,77
8	28.10.74	+ 23,79
9	28.10.74	+ 24,15
10	01.11.74	+ 24,11
11	02.11.74	+ 23,81
12	07.11.74	+ 23,70
13	07.11.74	+ 23,86
14	11.11.74	+ 24,75
15	11.11.74	+ 24,14
16	06.12.74	+ 24,16
17	06.12.74	+ 24,09
18	06.12.74	+ 23,82
19	16.12.74	+ 24,27
20	18.12.74	+ 24,12
21	18.12.74	+ 24,30
22	18.12.74	+ 24,45
23	06.02.75	+ 24,82
24	06.02.75	+ 23,75
25	13.02.75	+ 23,46
26	13.02.75	+ 23,31
		Média = + 24,08
		Desvio padrão = + 0,38
		CV = 1,60%

Tais dados garantem-nos que, para amostras cujos desvios em relação à referência são da ordem de $+ 20^0/00$, um desvio padrão da ordem de $\pm 0,4$ é representativo da precisão de cada amostra analisada.

Para o caso de amostras de $\delta^{15}N^0/00$ mais elevado, e cuja quantidade nos permitiu serem feitas 3 ou mais repetições, verificou-se que há um aumento no desvio padrão dos resultados, conforme mostra o Quadro V.

Quadro V - Análise estatística para diversas amostras possuindo $\delta^{15}N^0/00$ diferentes

Amostra	Número de repetições	$\delta^{15}N^0/00$ (med)	Desvio padrão	CV %
Fruto	26	+ 24,08	$\pm 0,38$	1,6
Folha	4	+ 67,12	$\pm 0,85$	1,3
Folha	4	+ 334,87	$\pm 5,91$	1,8
Folha	3	+ 548,67	$\pm 11,34$	2,0

Nota-se que, para os quatro casos, o coeficiente de variação dos resultados permanece da mesma ordem de grandeza. Como o coeficiente de variação pode ser tomado como uma medida da precisão de um experimento (GOMES, 1970), cremos serem perfeitamente válidos os resultados por nós encontrados. As discrepâncias observadas nos valores de desvio padrão são, provavelmente, consequências de erros de amostragem.

4.2. Análise de amostras de ar atmosférico

As amostras de ar atmosférico, coletadas pelos dois métodos citados em 3.2.5.1. e 3.2.5.2., foram analisadas e os resultados obtidos são apresentados no Quadro VI.

QUADRO VI - Resultados das análises de amostras de ar atmosférico

Oxidação de Cu metálico			Absorção por pirogalol		
data	hora	$\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$	data	hora	$\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$
12.11.74	12:00	+ 16,88	30.01.75	12:00	+ 16,79
03.12.74	20:00	+ 17,00	31.01.75	12:00	+ 16,68
04.12.74	11:00	+ 17,20	01.02.75	12:00	+ 16,69
04.12.74	17:00	+ 17,08	01.02.75	16:00	+ 16,75
06.12.74	12:00	+ 17,01	-	-	-
06.12.74	16:00	+ 17,05	-	-	-
09.12.74	12:00	+ 17,06	-	-	-
09.12.74	17:00	+ 17,07	-	-	-
10.12.74	12:00	+ 17,07	-	-	-
10.12.74	17:00	+ 16,95	-	-	-
Média = + 17,04			Média = + 16,70		
Desvio padrão = \pm 0,08			Desvio padrão = \pm 0,08		
CV = 0,5%			CV = 0,5%		
Média das 14 = + 16,95					
Desvio padrão = \pm 0,16					
CV = 0,9%					

Os dados acima mostram que não existe variação natural da relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ para o ar atmosférico, o que está de acordo com o que foi obtido por diversos autores (*JUNK & SVEC, 1958; DOLE et alii 1954; HOERING, 1955*).

A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos nos mostra a existência de uma diferença que, embora pequena, é significativa. A razão para o aparecimento de tal diferença está na possi

bilidade de formação de CO quando se utiliza o método de absorção de O_2 por pirogalol (BERGERSEN, 1973). O método de oxidação de Cu metálico torna-se, por esta razão, mais seguro que o método de absorção por pirogalol, embora os resultados obtidos neste último apresentem uma boa repetibilidade. Não podemos estar certos de que, caso usássemos soluções de pirogalol de diferentes idades, o efeito causado pela formação de CO fosse o mesmo, tornando a dar uma boa repetibilidade dos valores, uma vez que as soluções utilizadas apresentavam, todas, aproximadamente a mesma idade.

Para os dados apresentados, e considerando-se as 14 amostras juntamente, obtemos uma média de $+ 16,95^0/00$, um desvio padrão de $\pm 0,16$ e um coeficiente de variação de 0,9%; podemos então dizer que, dentro de um erro aproximado de $0,2^0/00$, os valores obtidos em ambos os métodos são válidos.

Nota-se também que o gás utilizado como referência está com um desvio $^0/00$ muito negativo em relação ao ar atmosférico. Se tomarmos como verdadeiro o valor médio das 10 amostras obtidas pelo método de oxidação de Cu metálico, teremos um desvio de $- 17,04^0/00$ para o gás de referência em relação ao ar atmosférico. Recomendaríamos, para trabalhos futuros, que fosse utilizado como referência o próprio ar atmosférico, ou um outro material qualquer cuja relação $^{15}N/^{14}N$ esteja próxima à do ar atmosférico.

4.3. Variação natural do ^{15}N em amostras de feijão da variedade carioca

Os resultados das análises de diversas amostras de feijão da variedade carioca são mostrados no Quadro VII. As amostras foram coletadas em 3 localidades, tendo também idades variáveis; uma mesma amostra foi dividida em parte aérea e raiz, ou folha, caule e raiz. O gás de referência utilizado foi o nitrogênio puro de um cilindro, cujo $\delta^{15}N^0/00$ em relação ao ar atmosférico é dado em 4.2..

Quadro VII - Resultados das análises de diversas amostras de feijão da variedade carioca

Amostra	Idade (dias)	Procedência	Nº de Repet.	$\delta^{15}\text{N}^0/00$ (med)
Folha 1	30	CENA	4	+ 21,54
Raiz 1	30	CENA	5	+ 26,17
Folha 2	30	CENA	8	+ 28,76
Caule 2	30	CENA	4	+ 37,28
Raiz 2	30	CENA	3	+ 35,42
P.Aérea 3	30	CENA	2	+ 18,37
Raiz 3	30	CENA	1	+ 23,11
Raiz 4	45-50	CENA	3	+ 38,22
Folha 5	90-100	ITAPORANGA	4	+ 25,55
Caule 5	90-100	ITAPORANGA	5	+ 28,23
Folha 6	90-100	ITABERÁ	4	+ 25,17
Caule 6	90-100	ITABERÁ	4	+ 31,26

Observa-se que existe uma variação da relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dentro da própria planta, sendo que a folha geralmente apresenta um desvio, em relação a referência, menor que o da raiz ou do caule, provavelmente devido a um maior acúmulo de nitrogênio na mesma. A diferença existente entre caule e raiz necessitaria de um número maior de dados para uma melhor interpretação.

Nota-se também que existe diferença entre plantas coletadas em locais diferentes, e mesmo entre aquelas coletadas em um mesmo local porém analisadas separadamente. Isto provavelmente é devido aos diversos tratamentos a que foi submetida a planta, ou seja, tipo de solo no qual está instalada, ocorrência ou não de nitrifica-

ção neste solo, adubação e tipo de adubo utilizado, ocorrência de fixação simbiótica, etc..

Porém, o mais importante a ser observado é que, para amostras de feijão da variedade carioca, coletadas em condições naturais, a variação máxima observada, em relação ao gás referência utilizado, foi de + 38,22⁰/oo, e a mínima foi de + 18,37⁰/oo, ou seja, existe uma faixa de variação de aproximadamente 20⁰/oo devida somente à variação natural. Isto significa que, para cada experimento realizado devemos ter testemunhas que sejam bem representativas para estarmos seguros de que diferenças menores que 20⁰/oo entre tratamento e testemunha não sejam devidas à variação natural.

4.4. Testes de fixação com raízes noduladas

Foram feitos 3 experimentos com raízes noduladas de feijão da variedade carioca, utilizando-se diferentes composições da mistura gasosa e diferentes concentrações em ¹⁵N. As composições das misturas gasosas utilizadas podem ser vistas no Quadro VIII.

Quadro VIII - Composições das misturas gasosas utilizadas nos testes de fixação em raízes noduladas

Gases	Exp. I	Exp. II	Exp. III
% N ₂	81,20	23,50	30,44
% O ₂	14,64	9,25	19,24
% A _r	4,16	67,10	50,19
% CO ₂	-	0,15	0,13
% ¹⁵ N	1,09	2,17	3,2

Os resultados das análises das amostras obtidas nos 3 exper

rimentos são apresentados no Quadro IX. As amostras foram preparadas pelo método de Dumas modificado.

QUADRO IX - Resultados das análises de amostras obtidas nos testes de fixação em raízes noduladas.

Exp. I			Exp. II			Exp. III		
Amostra	Rep.	$\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ (med)	Amostra	Rep.	$\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ (med)	Amostra	Rep.	$\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ (med)
Test.	2	+ 33,76	Test.	3	+ 38,22	Folha test.	8	28,73
1	1	+ 59,50	1	1	+ 175,75	Raiz test.	3	35,42
2	1	+ 48,47	2	1	+ 194,97	Caule test.	4	37,28
3	1	+ 85,90	3	1	+ 115,29	1	5	45,97
4	2	+ 70,96	4	1	+ 259,43	-	-	-
5	2	+ 47,26	5	1	+ 139,16	-	-	-
-	-	-	6	1	+ 100,66	-	-	-
-	-	-	7	1	+ 113,00	-	-	-
-	-	-	8	2	+ 82,32	-	-	-
-	-	-	9	2	+ 148,72	-	-	-

Pelos dados podemos observar que mesmo quando a percentagem de ^{15}N na mistura gasosa estava a 1,09% foi possível verificar a ocorrência de fixação simbiótica, uma vez que as amostras submetidas ao tratamento possuem $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ significativamente mais elevado que a amostra testemunha.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ mais altos, mostrados pelas amostras do experimento II, devem-se ao maior número de nódulos existentes nas raízes. Com isto o fator de diluição isotópica cai, elevando conseqüentemente o $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$. No caso do experimento III aconteceu

o contrário, ou seja, havia muita raiz e poucos nódulos, aumentando portanto o fator de diluição.

Porém o mais importante a ser observado é que nos 3 casos foi possível detectar-se a fixação simbiótica, mesmo em ^{15}N tão baixo quanto 1,09%. A investigação dos possíveis efeitos que as variações na concentração dos componentes gasosos da mistura poderiam ter na fixação simbiótica foge ao objetivo deste trabalho, permanecendo porém como sugestão para trabalhos futuros.

4.5. Testes de fixação em plantas inteiras

Foram feitos 3 experimentos nos quais plantas inteiras foram colocadas dentro de uma câmara e submetidas a uma mistura de gases contendo N_2 , conforme é descrito em 3.2.4..

Durante o transcorrer de cada experimento foram retiradas a mostras da mistura gasosa em circulação na câmara, sendo as mesmas analisadas, pelo método descrito em 3.2.7.1., com a finalidade de se determinar a concentração dos componentes gasosos e a percentagem de ^{15}N na mistura. Os resultados destas análises são mostrados no Quadro X e Gráfico 2.

As amostras de material vegetal foram analisadas pelo método descrito em 3.2.7.2., sendo os resultados apresentados no Quadro XI.

O experimento IV teve duração aproximada de 24 horas, o experimento V de 48 horas e o experimento VI de 50 horas.

Pela análise dos dados do Quadro XI nota-se que todas as amostras analisadas apresentam $\delta^{15}\text{N}_0$ /oo significativamente mais elevado que os encontrados para as testemunhas. Os altos valores encontrados sugerem uma boa eficiência de fixação em vista do curto tempo de duração do experimento.

Quadro X - Análises do gás da câmara feitas no decorrer dos experimentos

Exp.	V												VI		
	IV		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13:00	16:00	13:00
Am.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
dia	3/9	3/9	4/9	4/9	4/9	5/9	5/9	5/9	6/9	6/9	7/9	8/9			
hora	16:00	20:30	15:00	16:00	21:00	16:00	20:00	21:00	13:00	16:00	13:00	13:00	16:00	13:00	13:00
% N ₂	27,38	29,22	31,37	30,20	29,21	30,36	31,08	32,64	32,49	31,42	31,79	32,14			
% O ₂	21,86	21,04	19,15	19,87	19,15	18,22	18,50	18,54	16,70	18,83	18,50	18,46			
% A _r	50,50	48,91	47,85	48,83	49,67	48,49	47,12	47,47	46,57	47,55	47,63	47,19			
% CO ₂	0,26	0,83	1,63	1,10	1,27	2,93	3,30	1,35	4,24	2,20	2,08	2,21			
% ¹⁵ N	4,03	3,98	3,58	3,94	3,92	3,89	3,71	3,59	3,56	3,76	3,73	3,72			

Quadro XI - Resultado das análises de amostras dos testes de fixação com plantas inteiras

Exp.	Amostra	Número de repetições	δ% (média)
IV	1 P.aérea	2	420,75
	1 Raiz	1	434,80
	2 P.aérea	4	234,05
	2 Raiz	3	117,33
	3 P.aérea	3	113,37
	3 Raiz	2	50,19
	4 P.aérea	3	300,60
	4 Raiz	3	199,42
V	1 P.aérea	3	548,67
	1 Raiz	3	362,64
	2 P.aérea	3	649,89
	2 Raiz	2	494,77
	3 P.aérea	3	817,43
	3 Raiz	2	480,17
	4 P.aérea	3	277,24
	4 Raiz	3	262,07
VI	1 P.aérea	2	498,97
	1 Raiz	2	477,37
	2 P.aérea	2	494,60
	2 Raiz	2	362,67
Testemunhas	1 Caule	5	27,68
	1 Folha	9	26,20
	2 P.aérea	3	24,63
	2 Raiz	1	25,53
	3 P.aérea	1	29,10

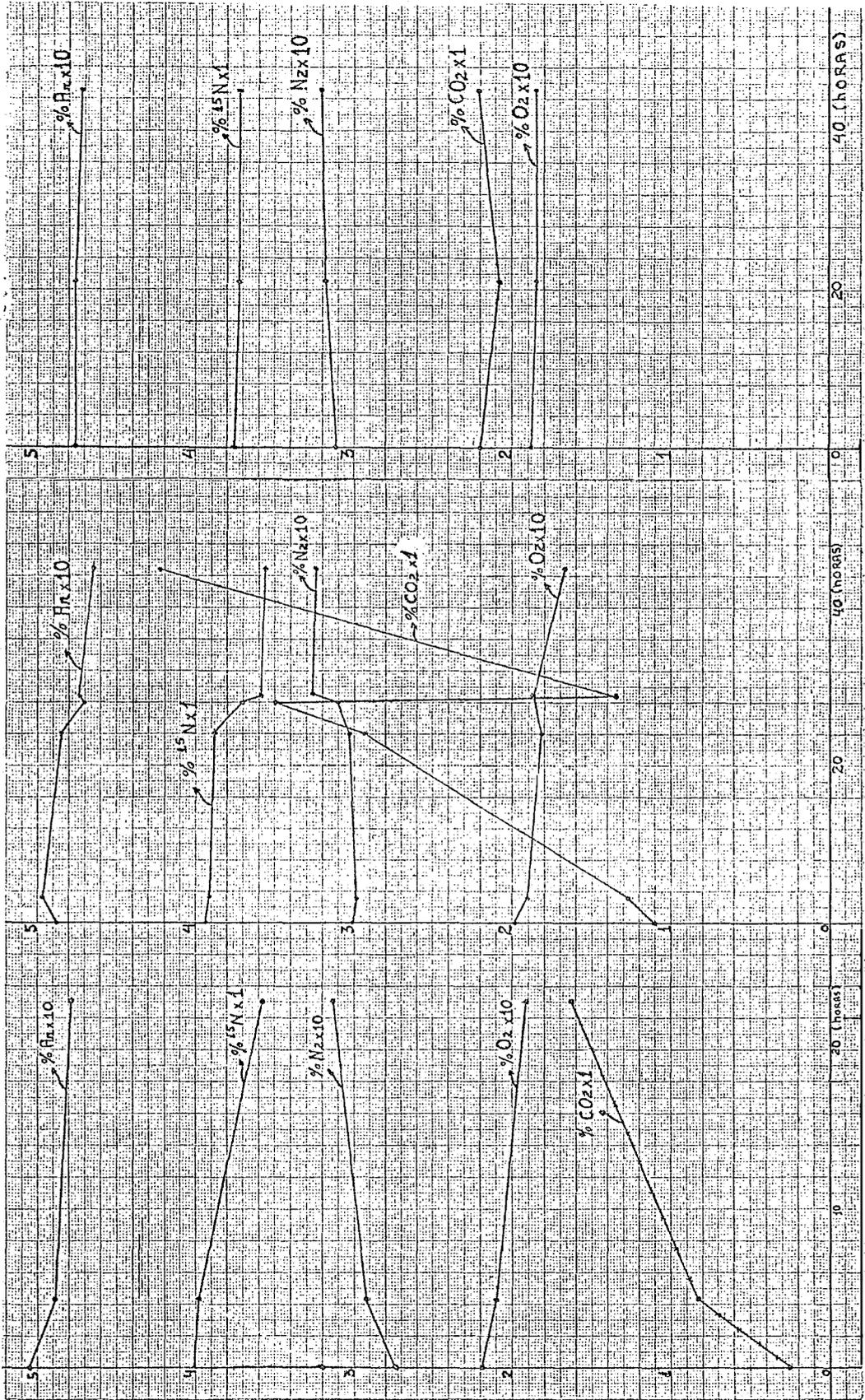


Gráfico 2 - Variações nas concentrações e teor de ¹⁵N na mistura gasosa, nos três experimentos.

Os altos valores de $\delta^{15}\text{N}^0/\text{oo}$ encontrados nas análises das partes aéreas das amostras são indicativos de uma rápida translocação do nitrogênio fixado. As diferenças nos valores observados dentro de um mesmo experimento e entre os experimentos V e VI são em sua maior extensão devidas às diferenças entre peso seco de nódulos e peso seco da planta propriamente dita, embora não possamos afirmar que a eficiência de fixação seja a mesma para cada caso. Fogem a esta afirmativa as amostras IV-3 e V-4 onde provavelmente a eficiência de fixação foi baixa e a amostra IV-1, onde provavelmente foi alta. As diferenças observadas entre o experimento IV e os experimentos V e VI eram de se esperar devido ao maior tempo de duração dos últimos. Nos dados apresentados no Quadro X e Gráfico 2 não foi levada em consideração para o cálculo da porcentagem de ^{15}N , a correção que deveria ser feita no pico 28 devido ao CO^+ proveniente da fragmentação de CO_2 (pico 44). Baseamo-nos, para tal, no fato de que a contribuição ao pico 28, devida ao pico 44, quando existe baixa concentração de N_2 com baixo enriquecimento em ^{15}N , é desprezível, não devendo portanto acarretar grandes diferenças na porcentagem de ^{15}N calculada.

Observa-se porém que nos experimentos IV e V a queda da porcentagem de ^{15}N nas amostras analisadas não é compatível com os teores de CO_2 apresentados, ou seja, a quantidade de CO_2 presente não é suficiente para que surjam quedas de tal ordem.

Não encontramos explicação segura e definitiva para tal fato. Podemos apenas lançar a hipótese que existe um gás contaminante cuja massa é 28, porém não saberíamos explicar a procedência de tal gás. Os resultados das amostras 4, 8 e 10 favorecem tal hipótese, indicando ainda que o gás contaminante é condensado pelo nitrogênio líquido. Vejamos como: as amostras 4 e 10 foram coletadas no início dos experimentos V e VI, depois da passagem da mistura gasosa por 2 "traps" mergulhados em nitrogênio líquido. Observa-se nestas amostras um aumento da porcentagem de ^{15}N em relação à amostra

anterior, não compatível com a diminuição do teor de CO_2 . No caso da amostra 8 a diminuição do teor de CO_2 foi feita através da passagem da mistura gasosa através de um "trap" contendo Ba(OH)_2 . Nota-se que a diminuição do teor de CO_2 não causou aumento mas sim diminuição no valor da percentagem de ^{15}N , indicando que o contaminante continua na amostra; refutamos a possibilidade de contaminação pelo ar atmosférico, analisando-se as variações sofridas pelos demais componentes gasos da mistura.

4.6. Comparação entre os métodos de Dumas modificado e o método de oxidação por hipobromito de sódio

Foram preparadas várias amostras de diferentes materiais, seguindo cada um dos métodos descritos em 3.2.6.1. e 3.2.6.2.. As amostras foram analisadas e os resultados obtidos são mostrados no Quadro XII.

Quadro XII - Resultados obtidos em análises de amostras de diversos materiais pelos métodos de Dumas modificado e oxidação por NaOBr.

Amostra	Método	nº de repet.	$\delta^{15}\text{N}/\text{oo}$ (med)	desvio padrão	CV %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Dumas	10	+ 17,68	0,03	0,16
	NaOBr	3	+ 17,40	0,13	0,75
Folha 1 (feijão)	Dumas	8	+ 28,73	0,14	1,40
	NaOBr	5	+ 28,71	0,10	0,77
Fruto (feijão)	Dumas	26	+ 24,08	0,38	1,56
	NaOBr	9	+ 21,37	0,27	1,28
Folha 2 (feijão)	Dumas	9	+ 26,04	0,16	0,62
	NaOBr	4	+ 23,49	0,35	1,48

Nota-se que, para as amostras de sulfato de amônio, os resultados obtidos por ambos os métodos são concordantes dentro de um erro de $0,2^0/100$. Para as amostras de folha 1 os resultados foram melhores, sendo os valores obtidos por ambos os métodos concordantes dentro de um erro de $0,01^0/100$. O erro maior observado entre as amostras de sulfato, deve-se provavelmente ao pequeno número de repetições utilizado nas preparações pelo método de oxidação por NaOBr.

As diferenças significativas encontradas nos valores obtidos pelos 2 métodos para as amostras de fruto e folha 2 não significam, em nossa opinião, a existência de fracionamento isotópico em qualquer dos métodos, uma vez que eles são concordantes nos outros dois casos. A diferença observada é mais provavelmente devida à presença de nitrato nas amostras, que não é transformado durante a digestão normal de Kjeldahl.

Podemos então dizer, que ambos os métodos poderão ser utilizados no preparo de amostras vegetais para análise isotópica de nitrogênio, desde que se tome cuidado de uma prévia transformação do nitrato na amostra a ser analisada pelo método de oxidação por NaOBr, para uma forma em que o nitrogênio possa ser liberado na digestão de Kjeldahl. Outra desvantagem do método de oxidação por NaOBr é que geralmente necessita-se de uma quantidade maior de matéria seca que a utilizada no método de Dumas modificado.

4.7. Determinação do N total de uma amostra pela medida da pressão obtida no sistema de admissão

O volume dos tubos de expansão de amostras foi calculado utilizando-se quantidades conhecidas de sulfato de amônio puro como amostras (FIEDLER & PROKSCH, 1972). Obteve-se um valor médio de $64,19 \text{ cm}^3$ com um desvio padrão de 3,13 e um coeficiente de variação de 4,9%, sendo este volume médio utilizado no cálculo do teor de N

de diversas amostras. Estávamos, portanto, introduzindo um erro de quase 5% em tais cálculos, que somados aos erros de amostragem, pesagem e leitura do manômetro, dão o erro total da determinação.

Os resultados obtidos na determinação do N total em 4 amostras pelos métodos de Kjeldahl e pela pressão de gás produzido são mostrados no Quadro XIII.

Quadro XIII - Comparação entre os resultados de N total obtidos pelos métodos de Kjeldahl e pela medida da pressão de gás produzida no método de Dumas.

Amostra	Kjeldahl			Calculado pela pressão do gás			ERRO RELATIVO %
	nº de repet.	% N	CV %	nº de repet.	% N	CV %	
1 Fruto	5	3,43	12,2	23	3,49	6,7	+ 1,7
2 Caule	5	1,33	0,75	5	1,25	5,7	- 6,4
3 Folha	5	2,72	0,33	6	2,85	2,6	+ 4,6
4 Folha	5	2,55	0,35	9	2,78	2,7	+ 8,3

Nota-se que existe um erro relativo muito grande entre os métodos. Pela análise dos coeficientes de variações vemos que as determinações feitas pelo método de Kjeldahl são bem mais precisas, exceto feita a amostra 1, estando portanto o erro observado, no método de medida da pressão produzida por amostra na combustão de Dumas. Em sua maior extensão tal erro é devido à não padronização dos volumes dos tubos de amostras, embora não possamos deixar de lado a possibilidade de erros de amostragem, pesagens, preparo de amostras e leitura de manômetro. Cremos serem estes últimos, no caso em questão, bastante pequenos em comparação com o primeiro devido aos cuidados tomados.

4.8. Determinação da quantidade de N_2 fixada

A quantidade de N_2 fixada por uma planta, em um determinado experimento, é dada por (BERGERSEN, 1973):

$$N_2 \text{ fixada (mg)} = \frac{N \text{ na amostra (mg)} \times A\% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na amostra}}{A\% \text{ de } ^{15}\text{N na fase gasosa}} \quad \dots \dots \dots (23)$$

Sendo $A\% \text{ } ^{15}\text{N na amostra}$ = a diferença entre as concentrações isotópicas absolutas da amostra e da testemunha.

Foi visto que os resultados dos experimentos realizados são dados em $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ de variação em relação a uma referência cuja concentração isotópica absoluta era de 0,358 átomos % de ^{15}N . Levando-se em conta a definição de $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ (equação 18) e a concentração isotópica absoluta do gás referência utilizado, demonstra-se que

$$1 \delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo} \cong 0,36 \times 10^{-3} \text{ átomos \% } ^{15}\text{N} \quad \dots \dots \dots (24)$$

Então a equação (23) poderá ser escrita da seguinte forma:

$$N_2 \text{ fixado (mg)} = \frac{N \text{ na amostra (mg)} \times 0,36 \times 10^{-3} (\delta^{15}\text{N}_{am} - \delta^{15}\text{N}_{test.})}{A\% \text{ de } ^{15}\text{N na fase gasosa}} \quad \dots \dots \dots (25)$$

sendo:

$\delta^{15}\text{N}_{am}$ = $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ de uma amostra analisada e que foi submetida a tratamento com $^{15}\text{N}_2$ num experimento

$\delta^{15}\text{N}_{test}$ = $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ da testemunha analisada, para o mesmo experimento

$A\% \text{ } ^{15}\text{N na fase gasosa}$ = $A\% \text{ de } ^{15}\text{N na mistura gasosa utilizada}$ no mesmo experimento.

N na amostra = quantidade de nitrogênio na amostra calculada com base na % de nitrogênio total apresentada pela mesma

Em nosso caso consideraremos a porcentagem de nitrogênio em feijão como sendo a média das porcentagens determinadas em 4.7. pelo método de Kjeldahl, uma vez que não foram feitas determinações para todas as amostras. Tal média nos dá um valor de 2,5% de nitrogênio.

Se considerarmos um experimento hipotético no qual a diferença entre $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ da amostra e testemunha analisadas fosse igual a 1, a porcentagem de ^{15}N na fase gasosa igual a 1 e partindo de 100 mg de amostra teríamos:

$$N \text{ fixado} = \frac{2,5 \times 0,36 \times 10^{-3} \times 1}{1} = 0,90 \times 10^{-3} \text{ mg de } N_2 \dots (26)$$

Vemos então que, teoricamente, e nas condições apresentadas acima, é possível determinar-se quantidades fixadas tão pequenas quanto 9 ug de N_2 por g de matéria seca.

No caso em que as condições do experimento e os $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ encontrados sejam diferentes basta multiplicarmos o novo valor:

$$\frac{(\delta^{15}N_{am} - \delta^{15}N_{test})}{A\% \text{ } ^{15}N \text{ na fase gasosa}} \dots \dots \dots (27)$$

encontrado pelo que foi obtido pela equação (26) que teremos as quantidades de N_2 fixado nas novas condições.

Os resultados obtidos nos experimentos por nós realizados são mostrados no Quadro XIV.

Quadro XIV - Cálculo da quantidade de N_2 fixado e da razão de fixação para os experimentos realizados.

	Am	A*	% ^{15}N no gás	N fix. ug/100 mg	N fix. ug/g	Razão de fixação ug/g.h.
I	1	25,75		21,25	212,50	17,71
	2	14,71		12,14	121,40	10,12
	3	52,14	1,09	43,05	430,50	35,88
	4	37,20		30,71	307,10	25,60
	5	13,50		11,15	111,50	9,29
II	1	137,54		57,04	570,40	47,54
	2	156,75		65,01	650,10	54,18
	3	77,07		31,96	319,60	26,64
	4	221,21		91,75	917,50	76,45
	5	100,94	2,17	41,86	418,60	34,89
	6	62,44		25,90	259,00	21,58
	7	74,78		31,01	310,10	25,84
	8	44,10		18,29	182,90	15,24
	9	110,50		45,83	458,30	38,19
III	1	12,16	3,2	3,42	34,2	2,85
IV	1	401,14		93,53	935,30	38,97
	2	149,06		34,75	347,50	14,48
	3	55,15	3,86	12,86	128,60	5,36
	4	223,38		52,08	520,80	21,70
V	1	429,02		102,42	1024,20	21,33
	2	545,70		130,27	1302,70	27,14
	3	622,17	3,77	148,53	1485,30	30,94
	4	243,02		58,01	580,10	12,08
VI	1	461,64		111,10	1111,00	22,22
	2	402,00	3,74	96,74	967,40	19,35

$$* = \delta^{15}N_{am} - \delta^{15}N_{test}$$

No caso de experimentos com plantas inteiras tomou-se $\delta^{15}\text{N}_{\text{am}}$ como sendo a média dos $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ encontrados para parte aérea e raiz de uma mesma planta. A porcentagem de ^{15}N na mistura gasosa foi tomada como média das medidas realizadas durante cada experimento, apesar do erro existente e comentado em 4.5..

O $\delta^{15}\text{N}_{\text{test}}$ foi tomado, em todos os casos, como sendo a média das amostras testemunhas analisadas.

Os dados vem confirmar o que já foi discutido em 4.4. e 4.5. quanto às diferenças observadas entre amostras de um mesmo experimento. Não podemos afirmar que as diferenças observadas sejam devidas a maior ou menor eficiência de fixação, uma vez que os nódulos de cada planta não foram pesados após cada experimento.

Pela análise dos dados obtidos para razões de fixação vemos que poderíamos diminuir o tempo de exposição, ou a porcentagem de ^{15}N , ou ambos, que ainda estaríamos dentro da faixa de detecção. Tal fato nos abre um novo campo que é a verificação da possibilidade de uso de N_2 desenriquecido em ^{15}N em experimentos deste tipo.

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos podemos concluir que:

- a. com a metodologia empregada é perfeitamente possível o uso de $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. Que remos ainda sugerir que tal metodologia poderá ser utilizada em estudos mais detalhados da fixação simbiótica desde que se tome um maior cuidado no controle das condições dos experimentos.
- b. os dados apresentados sugerem existir a possibilidade de utilização de atmosferas contendo N_2 desenriquecido em ^{15}N para estudos de fixação simbiótica.

- c. não existe variação natural na relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ no ar atmosférico, ou seja, a concentração de ^{15}N no mesmo é constante, o que concorda plenamente com resultados anteriormente obtidos por outros autores.
- d. existe variação natural da relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ em amostras de feijão. Esta variação ocorre entre plantas coletadas em diferentes locais, entre plantas coletadas em um mesmo local porém submetidas a diferentes tratamentos, e mesmo dentro de uma própria planta.
- e. o desvio máximo dado em unidades de $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ encontrado para uma amostra coletada em condições naturais, em relação ao gás referência utilizado, foi de $+38,22^{\circ}/\text{oo}$, e o mínimo foi de $18,37^{\circ}/\text{oo}$. Isto nos dá uma faixa de variação de aproximadamente $20^{\circ}/\text{oo}$ devida somente à variação natural. Desta maneira a amostra testemunha de um experimento deve ser bastante representativa para que tenhamos certeza de que diferenças menores que $20^{\circ}/\text{oo}$ entre amostra e testemunha não sejam devidas à variação natural.
- f. o gás referência utilizado apresenta um desvio $\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$ muito negativo em relação ao ar atmosférico. O valor encontrado foi $-17,04^{\circ}/\text{oo}$. Recomendaríamos que para trabalhos futuros fosse utilizado como referência o próprio ar atmosférico ou um material qualquer cuja relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ seja próxima a do ar atmosférico.
- g. o método de coleta de N_2 atmosférico pela eliminação do O_2 através de oxidação de Cu metálico revelou-se melhor que o método de absorção do O_2 por solução de pirogalol, uma vez que neste último existe a possibilidade de formação de CO durante a amostragem.
- h. tanto o método de Dumas modificado, quanto o método de oxidação por NaOBr podem ser utilizados no preparo de amostras vegetais para análise isotópica de nitrogênio visando detectar pequenas variações na relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. O método de oxidação por NaOBr tem a

desvantagem de, além de necessitar geralmente de uma quantidade maior de amostra, ser necessário o tratamento prévio da mesma com a finalidade de transformar o nitrato para uma forma em que ele possa ser liberado na digestão de Kjeldahl.

- i. a determinação do teor de N total de uma amostra através da medição da pressão de gás produzida na combustão de Dumas mostrou erros relativos grandes quando comparados com a mesma determinação feita pelo método de Kjeldahl. A fonte maior de tal erro está na não padronização de volumes dos tubos de expansão de amostras utilizados.

6. RESUMO

Foram utilizadas atmosferas gasosas contendo $^{15}\text{N}_2$ com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica em feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Tanto nos testes de fixação em raízes noduladas como nos testes de fixação em plantas inteiras, nos quais as mesmas foram colocadas dentro de uma câmara de crescimento especialmente construída, os resultados obtidos foram positivos, e sugerem ser a metodologia usada bastante promissora para estudos mais detalhados sobre os vários aspectos da fixação simbiótica.

Amostras de ar atmosférico foram purificadas absorvendo-se

O₂ e CO₂ das mesmas por dois métodos, sendo o N₂ assim obtido analisado e os resultados comparados.

Foram analisados amostras de feijão coletadas em condições naturais com o intuito de se verificar a existência e a extensão da variação natural de ¹⁵N nas mesmas.

Diversas amostras foram preparadas para análise por meio de 2 métodos, sendo feita a comparação entre os resultados obtidos.

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa Atlas-Varian modelo CH-4. Os resultados são dados em δ⁰/oo de variação em relação a um gás de referência.

7. SUMMARY

Gaseous atmospheres containing $^{15}\text{N}_2$ with low enrichment were used to test symbiotic nitrogen fixation in beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). The tests of fixation in nodulated roots and the tests of fixation in the whole plant, in which the plants were placed inside a especially constructed growth chamber, gave positive results and suggest that the methodology used can be very helpfull in more detailed studies on symbiotic fixation.

Samples of atmospheric air were purified by absorption of

O₂ and CO₂ by two methods. The purified N₂ obtained was analysed and the results were compared,

Samples of bean plant material were collected in natural conditions and analysed for ¹⁵N natural variation.

Several samples were prepared for ¹⁵N isotopic analysis by two methods. The results obtained were compared.

All samples were analysed in an Atlas-Varian Ch-4 model mass spectrometer, and the results were given in δ¹⁵N ‰ variation in relation to a standard gas.

8. BIBLIOGRAFIA

- APRISON, M.H. & BURRIS, R.H. - 1952 - Time course of fixation of N₂ by excised soybean nodules. Science, 115: 264-265.*
- BECKING, J.H. - 1965 - Nitrogen fixation and mycorrhiza in *Podocarpus* root nodules. Plant and Soil, 23: 213-226.*
- BERGERSEN, F.J. - 1973 - The use of ¹⁵N in N₂ fixation experiments, Campinas, Instituto Agronômico de Campinas. 39 p. (mimeografado).*
- BOND, G. & MAC CONNEL, J.T. - 1955 - Nitrogen fixation in detached non-legume root nodules. Nature, 176: 606.*

- BOND, G. & MAC CONNEL, J.T. - 1961 - The oxygen relation of nitrogen fixation in root nodules. *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 1: 93-99.
- BREMNER, J.M. - 1965 - Isotope-ratio analysis of nitrogen in nitrogen-15 tracer investigations. In: Black, C.A., ed. *Methods of soil analysis*. Madison, Wisc., American Society of Agronomy V.2, cap. 86, 1256-1286.
- BREMNER, J.M.; CHENG, H.H.; EDWARDS, A.P. - 1966 - Assumptions and errors in nitrogen tracer research. *The Use of Isotopes in Soil Organic Matter Studies* (Report of the FAO/IAEA Technical Meeting Brunswick, 1963), New York, Pergamon Press, 429-442.
- BURRIS, R.H. - 1942 - Distribution of isotopic nitrogen in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 143: 509-517.
- _____ ; EPPLING, F.J.; WAHALIN, H.B. & WILSON, P.W. - 1943 - Biological N fixation with isotopic N. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 7: 258-262.
- _____ ; MAGEE, W.E. & BACH, M.K. - 1955 - pN_2 and pO_2 functions for nitrogen fixation by encised soybean nodules. *Ann. Acad. Sci. Fennical, Serie A II*, 60: 190-199.
- _____ . - 1974 - Methodology. IN: Quiespel, A., ed. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North Holland, cap. 2.
- CAMARGO, O.A. - 1971 - Contribuição ao estudo de ar do solo. Tese de Mestrado, ESALQ-USP, Piracicaba, 61 p.
- DELWICHE, C.C. & WIJLER, J. - 1956 - Non-symbiotic nitrogen fixation in soil. *Plant and Soil*. 7: 113-129.
- _____ . - 1970 - The nitrogen cycle. IN: Scientific American ed. *The biosphere*, San Francisco, 137-146.
- _____ & STEYN, P.L. - 1970 - Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environmental Science and Technology*, 4: 929-935.

- DOLE, M.; LANE, G.A.; RUDD, D.P. & ZAUKELES, D.A. - 1954 - Isotopic composition of atmospheric oxygen and nitrogen. *Geoch. et Cosmoch. Acta*, 6: 65-78.
- DUCATTI, C.; DE POLLI, H. & TRIVELIN, P.C.O. - 1974 - Espectrômetro de massa da Varian-Mat - CH-4. CENA, Piracicaba, 24 p. (mimeogra^o fado).
- DUCKWORTH, H.E. - 1958 - Mass spectrometry. Cambridge, Cambridge University Press.
- FEIGIN, A.; KOHL, D.H.; SHEARER, G.B. & COMMONER, B. - 1974a. - Variation in the natural nitrogen-15 abundance in nitrate mineralized during incubation of several illinois soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38: 90-95.
- _____ ; KOHL, D.H.; SHEARER, G.B. & COMMONER, B. - 1974b. The amount and nitrogen-15 content of nitrate in soil profiles from two central illinois fields in a corn-soybean rotation. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38, p. 465-471.
- FIEDLER, R. & PROKSCH, G. - 1972 - The determination of the nitrogen content and nitrogen-15 abundance by means of the nitrogen gas generated from inorganic and organic materials. *Analytica Chimica Acta*, 60, 277-285.
- GOMES, F.P. - 1970 - Curso de Estatística Experimental. Piracicaba, São Paulo, Livraria Nobel, 430 p.
- HARRIS, G.P. & MORRISON, T.M. - 1958 - Fixation of nitrogen-15 by excised nodules of *Coriaria arborea*, Lindsay. *Nature*, 182: p. 1812.
- HAUCK, R.D. & BREMNER, J.M. - 1964 - The methodology of ¹⁵N research. Soil and fertilizer nitrogen reserarch, a projection into the future. Wilson Dam, Ala., Tennessee Valley Authority, 97-110.
- _____ & BYSTRON, M. - 1970 - ¹⁵N-a selected bibliography for agricultural scientists. Ames, Iowa State Univeristy Press, 260p.

- HAUCK, R.D. - 1971 - Quantitative estimates of nitrogen cycle processes. IN: IAEA, ed., nitrogen 15 in soil-plant studies. Proc. of the FAO/IAEA Technical meeting, Sofia, 1969.
- _____. - 1973 - Nitrogen tracers in nitrogen cycle studies - past use and future needs. Journal of Environmental Quality, 2(3): 317-327.
- HOERING, T. - 1955 - Variations of nitrogen-15 in naturally occurring substances. Science, 122, 1233-1234.
- _____. - 1957 - The isotopic composition of the ammonia and the nitrate ions in rain. Geoch. et Cosmoch. Acta, 11, 165-170.
- _____, & MOORE, H.E. - 1958 - The isotopic composition of the nitrogen in natural gases and associated crude oils. Geoch. et Cosmoch. Acta, 13, 225-232.
- JUNK, G. & SVEC, H.J. - 1958 - The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. Geoch. et Cosmoch. Acta, 14, 234-243.
- KLUCAS, R.V. & BURRIS, R.H. - 1967 - Locus of nitrogen fixation in soybean nodules. Fixation by crushed nodules. Biochem. Biophys. Acta, 136, 399-401.
- KOHL, D.H.; SHEARER, G.B. & COMMONER, B. - 1971 - Fertilizer nitrogen contribution to nitrate in surface water in a corn belt watershed. Science, 174, 1331-1334.
- _____, _____ & _____. - 1973 - Variation of ^{15}N in corn and soil following application of fertilizer nitrogen. Soil Soci. Soc. Amer. Proc., 37, 888-892.
- MACHATA, H.A.; BURRIS, R.H. & WILSON, P.W. - 1947 - Fixation of isotopic nitrogen by excised nodules. J. Biol. Chem., 171 605-609.
- MAGEE, W.E. & BURRIS, R.H. - 1954 - Fixation of nitrogen-15 by excised nodules. Plant Physiol., 29: 199-200.

- MAYLAND, H.F. & MCINTOSH, T.H. - 1966 - Availability of biologically fixed atmospheric nitrogen-15 to higher plants. *Nature*, 209: 421-422.
- MACKINNEY, C.R.; MCCREA, J.M.; EPSTEIN, S.; ALLEN, H.A. & UREY, H.C. - 1950 - Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope ratios. *Review Science. Instruments*, 21(8): 724-730.
- MORRISON, T.M. - 1961 - Fixation of nitrogen-15 by excised nodules of *Descuria toumatou*. *Nature*, 189, p. 945.
- NIER, A.O. - 1950 - A redetermination of the relative abundance of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium. *Phys. Rev.*, 77, 789-793.
- NORRIS, D.O. - 1964 - Techniques used in work with *Rhizobium*. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Berkshire, England* (Bull. n° 47).
- OGHOGHORIE, C.G.O. & PATE, J.S. - 1972 - Exploration of the nitrogen transport system of a nodulated legume using ¹⁵N. *Planta*, 104: 35-42.
- PARWELL, A.; RYHAGE, R. & WICKMAN, E.F. - 1957 - Natural variation in the relative abundance of the nitrogen isotopes. *Geoch. et Cosmoch. Acta*, 11: 165-170.
- PROKSCH, G. - 1969 - Routine analysis of ¹⁵N in plant material by mass-spectrometry. *Plant and Soil*, 31(2): 380-384.
- RAGGIO, N.; RAGGIO, M. & BURRIS, R.H. - 1950 - Nitrogen fixation by nodules formed on isolated bean roots. *Biochem. Biophys. Acta*, 32: 274-275.
- RENNIE, D.A. & PAUL, E.A. - 1971 - Isotope methodology and techniques in soil-plant nutrition and plant physiology. *Sask. Institute of Pedology, Public. n° 76*, p. 19-42.
- RITTENBERG, D. - 1946 - The preparation of gas samples for mass-spectrometric analysis. IN: *Preparation and Measure of Isotopic Tracers*. D.W.Wilson, A.O.C.Nier & S.P.Reiman, eds. 1946. Ann. Arbor, Michigan.

- ROSS, P.J.; MARTIN, A.E. & HENZELL, E.F. - 1964 - A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil: plant:atmosphere systems. *Nature*, 204: 444-447.
- RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y & SALATI, E. - *no prelo* - Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil grown sugar cane seedlings. *Soil. Biol. Biochem.*
- SHEARER, G.; KOHL, D.H. & COMMONER, B. - 1974a - The precision of determinations of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers and shelf-chemicals. *Soil Science*, 118(5): 308-316.
- _____ ; DUFFY, J.; KOHL, D.H. & COMMONER, B. - 1974b - A steady-state model of isotopic fractionation accompanying nitrogen transformations in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38, 315-322.
- STEVENSON, G. - 1959 - Use of ^{15}N in the study of fixation of atmospheric nitrogen by nonnodulated seed plants. *Proceedings of the Second International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy*, 1958, 27: 51-57.
- TOVE, S.R.; NISS, H.F. & WILSON, P.W. - 1950 - Fixation of $^{15}\text{N}_2$ by excised nodules of leguminous plants. *J. Biol. Chem.* 184: 77-82.
- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E. & MATSUI, E. - 1973 - Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massa. *CENA, Boletim Técnico n° 2*, Piracicaba, 41 p.
- VIEIRA, O.J. - 1974 - Concentrações de D e ^{18}O nas águas de precipitação e superfície dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Tese de Mestrado, ESALQ-USP, Piracicaba, 153 p.
- VIRTPANEN, A.I.; MOISIO, T.; ALLISON, R.M. & BURRIS, R.H. - 1954 - Fixation of molecular nitrogen by excised root nodules of the Alder. *Acta Chemica Scandinavica*, 8: 1730-1731.
- _____, _____ & BURRIS, R.H. - 1955 - Fixation of nitrogen by nodules excised from illuminated and darkened plants. *Acta Chemica Scandinavica*, 9: 184-186.
- WILSON, P.W. - 1971 - The background. IN: J.R.Postgate, ed. *The Chemistry and biochemistry of nitrogen fixation*. Plenum Press, p. 1-18.