

**EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO  
DA *Azolla* E RECUPERAÇÃO, PELO ARROZ (*Oryza sativa* L.),  
DO N(<sup>15</sup>N) - *Azolla* INCORPORADO AO SOLO**

**MARIA DE LOURDES LIVA**

**Orientador : SIU MUI TSAI SAITO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Agronomia. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Maio - 1985

aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

- . Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do Dr. Enéas Salati, pelas facilidades proporcionadas.
- . À Dr<sup>a</sup> Siu Mui Tsai Saito, pela orientação, estímulo, críticas e sugestões.
- . Aos Drs. Reinaldo L. Victória e Paulo C.O. Trivelin pela valiosa colaboração.
- . Às Seções de Microbiologia do Solo e Ciências Ambientais do CENA, pelas análises e facilidades oferecidas.
- . Ao Dr. Nilson A. Vila Nova, pelo estímulo e amizade.
- . Aos colegas e amigos da SMS Soninha, Eleonora, Binho, Marli, Beto, Paulo, Sonia, Edilberto, Amália, Chiquinho, Indiara, Lúcia e Iraci, pelo inestimável auxílio e companheirismo.
- . Ao CNPq e CNEN pelo suporte financeiro
- . À Publique pelo trabalho de datilografia e impressão.
- . A todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

## Í N D I C E

	-Pág.
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Azolla</i> : uma apresentação.....	4
2.1.1. Biologia.....	7
2.2. Fisiologia.....	12
2.2.1. Crescimento.....	12
2.2.2. Composição.....	14
2.2.3. Fotossíntese.....	17
2.2.4. Fixação do Nitrogênio pela <i>Anabaena</i> .....	19
2.2.4.1. Acúmulo de nitrogênio pelo com- plexo simbiótico.....	20
2.2.5. Relação fotossíntese - Fixação do N <sub>2</sub> .....	23
2.2.6. Transferência do N fixado, da <i>Anabaena</i> e <i>Azolla</i> .....	25
2.3. Fatores Ambientais.....	27
2.3.1. Requerimentos nutricionais.....	28
a) Nitrogênio.....	28
b) Outros nutrientes.....	30
2.3.2. Luz.....	33
2.3.3. pH da água.....	34
2.3.4. Temperatura.....	35
2.4. Medidas da Fixação.....	37

	Pág.
2.4.1. Redução do acetileno.....	37
2.4.2. Uso do isótopo $^{15}\text{N}$ .....	39
2.4.2.1. Uso do $^{15}\text{N}_2$ gás.....	40
2.4.2.2. Uso do substrato enriquecido com $^{15}\text{N}$ .....	41
2.5. Uso da <i>Azolla</i> .....	42
2.5.1. Potencial de utilização da <i>Azolla</i> no Bra- síl.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1. Fatores do Meio e a Simbiose <i>Azolla-Anabaena</i> ....	52
3.1.1. Metodologia para incubações "in situ", vi- sando medidas da atividade da nitrogenase	53
3.1.2. Comportamento de espécies de <i>Azolla</i> em re- lação ao pH da solução.....	55
3.1.3. Influência da luz e temperatura diurna na atividade da enzima nitrogenase.....	56
3.1.4. Influência de fontes e doses de nitrogê- nio no desenvolvimento e na fixação de $\text{N}_2$ pela associação <i>Azolla-anabaena</i> .....	56
3.2. Marcação da <i>Azolla</i> com $^{15}\text{N}$ em solução.....	57
3.3. Recuperação pelo arroz do N da <i>Azolla</i> incorpora- da ao solo.....	59
3.3.1. Método indireto usando solo marcado.....	60
3.3.2. Método direto usando <i>Azolla</i> marcada.....	61
3.3.3. Tratos culturais e coleta e análises das plantas de arroz.....	62

	Pág.
3.4. Determinação do N derivado do Solo e da <i>Azolla</i> incorporada.....	63
3.4.1. Método direto.....	63
3.4.2. Método indireto.....	64
3.5. Recuperação do $^{15}\text{N}$ incorporado ao solo na forma de <i>Azolla</i> .....	64
4. RESULTADOS.....	66
4.1. Fatores do meio-ambiente e a simbiose <i>Azolla-anabaena</i> .....	66
4.1.1. Determinação da atividade da nitrogenase (redução $\text{C}_2\text{H}_2$ "in situ").....	66
4.1.2. Comportamento de espécies de <i>Azolla</i> em relação ao pH do meio.....	68
4.1.3. Influência da luz e temperatura diurna na atividade da enzima nitrogenase.....	75
4.1.4. Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de $\text{N}_2$ pela <i>Azolla</i> .....	76
4.2. Marcação da <i>Azolla</i> com $^{15}\text{N}$ em solução.....	84
4.3. Recuperação, pelo arroz, do $^{15}\text{N}$ da <i>Azolla</i> incorporada ao solo.....	86
5. DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÕES.....	97
7. LITERATURA CITADA.....	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
	Determinação da atividade da nitrogenase (redução de $C_2H_2$ ) "in situ" em <i>Azolla caroliniana</i> em vasos plásticos mantidos em casa-de-vegetação, após 15 dias de desenvolvimento. Médias de 3 repetições.....	67
2	Comportamento das espécies de <i>Azolla</i> em relação ao pH do meio - Produção de biomassa (g matéria seca/vaso) após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	71
3	Comportamento de espécies de <i>Azolla</i> em relação ao pH do meio - Atividade da nitrogenase ( $\eta mol C_2H_4/g.h$ ), após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	72
4	Comportamento de espécies de <i>Azolla</i> em relação ao pH do meio - Concentração de N(%) na biomassa obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	73

## TABELA

## Página

5	Comportamento de espécies de <i>Azolla</i> em relação ao pH do meio - N total (mg / vaso) na biomassa, obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	74
6	Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de N <sub>2</sub> pela <i>Azolla</i> - Produção de biomassa (g de matéria seca/vaso) após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	80
7	Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de N <sub>2</sub> pela <i>Azolla</i> - Atividade da nitrogenase ( $\eta$ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g.h) após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de 3 repetições.....	81
8	Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de N <sub>2</sub> pela <i>Azolla</i> - Concentração de N(%) na biomassa obtida após 15 dias de desenvol	



## TABELA

## Página

	vimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.....	82
9	Influência e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de $N_2$ pela <i>Azolla</i> - N total (mg/vaso) na biomassa obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.....	83
10	Marcação da <i>Azolla caroliniana</i> com $^{15}N$ em solução de uréia a 4% átomos de $^{15}N$ durante 15 dias de crescimento. Médias de 3 leituras.....	85
11	Recuperação pelo arroz do nitrogênio da <i>Azolla</i> incorporada ao solo. Plantas colhidas aos 63 dias após plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Determinações obtidas através do método indireto, onde se utilizou solo marcado (0,7% át. de $^{15}N$ ) e <i>Azolla caroliniana</i> marcada .....	89

## TABELA

## Página

- 12      Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Plantas colhidas aos 63 dias após plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Determinações obtidas através do método direto, onde se utilizou *Azolla caroliniana* marcada (2,81% át. de  $^{15}\text{N}$ ) e solo não marcado..... 90
- 13      Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Peso da matéria seca (g/vaso); N-total (mg/vaso) e nitrogênio derivado da *Azolla* (mg/vaso) de plantas colhidas aos 63 dias após o plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Método indireto, onde se utilizou solo marcado (0,7% át. de  $^{15}\text{N}$ ) e *Azolla caroliniana* não marcada..... 91
- 14      Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Peso da matéria seca (g/vaso); N total (mg/vaso) e nitrogênio derivado da *Azolla* (mg/vaso) de plantas colhidas aos 63 dias após o plan-

tio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Método direto, onde se utilizou <i>Azolla caroliniana</i> marcada (2,81% át. de $^{15}\text{N}$ ) e solo não marcado.....	92
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO		Página
1	Sumário de classificação taxonômica da <i>Azolla</i> .....	8
2	Composição da solução modificada de Hoagland.....	53
3	Resultados da análise química do solo utilizado para a incorporação da <i>Azolla</i> .....	59
4	Delineamento experimental usado para o método indireto de avaliação da recuperação do N da <i>Azolla</i> com uso de solo marcado.....	60
5	Delineamento experimental do método direto de avaliação da recuperação do N da <i>Azolla</i> com uso de <i>Azolla</i> marcada...	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Distribuição das espécies de <i>Azolla</i> .....	5
2	Corte transversal do lóbulo superior da folha.....	10
3	Heterocisto - Modelo do fluxo de carbono e nitrogênio entre heterocisto e célula vegetativa em cianobactéria.....	11
4	Distribuição das espécies de <i>Azolla</i> no Brasil.....	48
5	Influência da luz e temperatura diurna na atividade da nitrogenase em <i>Azolla</i> ...	79

EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO  
DA *Azolla* E RECUPERAÇÃO, PELO ARROZ (*Oryza sativa* L.),  
DO N(<sup>15</sup>N)-*Azolla* INCORPORADO AO SOLO

MARIA DE LOURDES LIVA

Orientador: SIU MUI TSAI SAITO

RESUMO

Foram realizados ensaios, em casa-de-vegetação, a fim de se observar efeitos do meio ambiental sobre o complexo simbiótico *Azolla-Anabaena*. Baseado em estudos da atividade da nitrogenase, propôs-se uma metodologia para medidas "in situ", na qual não ocorre perturbação no ambiente de desenvolvimento da *Azolla*. Concluiu-se que a metodologia proposta é viável.

Espécies de *Azolla* foram submetidas a 3 níveis de pH em solução nutritiva. Constatou-se diferenças varietais, sendo que as espécies que se mostraram mais tolerantes à acidez foram a *A. microphylla* e *A. filiculoides*, pelo maior acúmulo de nitrogênio na matéria seca e produção de biomassa, enquanto que *A. nilotica* foi a mais sensível.

A variação da atividade da enzima nitrogenase foi correlacionada com a intensidade luminosa e temperatura diur

na, obtendo-se o ponto de máxima atividade diurna.

*Azolla caroliniana* foi marcada com  $^{15}\text{N}$  em solução a 4% átomos  $^{15}\text{N}$ , na forma de uréia (100 ppm de N), obtendo-se material marcado a 2,81 % átomos  $^{15}\text{N}$ , o qual foi incorporado a solo Terra Roxa Estruturada. Após um período de três semanas, plantou-se arroz (IAC-1278), sob regime de inundação.

Para se determinar as taxas de recuperação, pelo arroz, do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo, dois métodos foram utilizados: método direto, onde incorporou-se *Azolla caroliniana* marcada (2,81 % át.  $^{15}\text{N}$ ), em duas doses (10 e 20 g de matéria fresca por vaso), além do controle sem incorporação e indireto, utilizando-se solo TRE marcado a 0,7 %  $^{15}\text{N}$ , já estabilizado, ao qual foi incorporada *Azolla caroliniana* não marcada, nas mesmas doses do método direto.

Através do método direto foi determinada uma recuperação de 11 e 13% respectivamente, para a maior e menor dose de *Azolla* incorporada. Este método mostrou-se ser o mais preciso em comparação com o método indireto que, pela grande variabilidade nas medidas não é recomendado para este tipo de determinação.

SOME ENVIRONMENTAL EFFECTS ON THE *Azolla*  
DEVELOPMENT AND RECOVERY, BY RICE (*Oryza sativa* L.),  
OF THE N(<sup>15</sup>N)-*Azolla* INCORPORATED IN THE SOIL

MARIA DE LOURDES LIVA

Supervisor: SIU MUI TSAI SAITO

SUMMARY

Experiments were carried out under greenhouse conditions to study, environmental effects on the *Azolla-Anabaena* association. The need of an appropriate method to measure the nitrogenase activity of *Anabaena* was discussed, as well as the purpose of a method for "in situ" measurements. The method showed more accuracy and can be applied to routine analyses.

Varietal differences were observed and *A. microphylla* and *A. filiculoides* were the most tolerant species to low pH solution. They showed the highest biomass production and N accumulation in dry matter. *A. nilotica* was the most sensitive species to pH.

*Azolla caroliniana* was labelled by using <sup>15</sup>N-urea (100 ppm) in solution at 4% atom <sup>15</sup>N excess. Fresh *Azolla* at enrichment of 2.81% atom <sup>15</sup>N in plant tissue, was incorporated



(10 and 20 g fresh weight per pot) to an Oxic Paleudalf Soil ("Terra Roxa Estruturada" and incubated for 3 weeks. Rice (IAC-1278 variety) seeds were sown and flooded after emergence.

Two methods were used to follow the N-*Azolla* recovery in rice: (a) direct method, incorporating labelled *Azolla* (2.81% atom  $^{15}\text{N}$  excess) and (b) indirect method, using labelled soil (0.7% atom  $^{15}\text{N}$  excess) and unlabelled *Azolla*.

The recovery of N averaged 13% and 11% when 10 and 20 g of *Azolla* per pot were used, respectively. Measurement errors by using direct method was averaged 10% and 13% for 10 and 20 g of *Azolla*, respectively. The indirect method gave errors higher than 50%. The direct method showed, therefore, to be more accurate under this experimental condition.

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo simbiótico *Azolla-Anabaena azollae*, uma "indestrutível fábrica de fertilizante nitrogenado", como é conhecida no oriente, constitui-se numa atraente fonte de adubação nitrogenada para o arroz, sob condições de inundação.

Apesar de ter sido utilizada e estudada há milênios no sudeste asiático, somente nos últimos anos tem merecido pesquisas no mundo ocidental, e, devido à pouca tradição em seu uso entre nós, há, ainda hoje, ampla necessidade de estudos básicos, visando sua aplicação no campo.

Antes de definir-se as condições para o cultivo da *Azolla* como adubo verde em uma região específica, alguns componentes devem ser estudados. Os fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento e a fixação simbiótica do nitrogênio necessitam uma melhor compreensão, para que se estabeleça um manejo adequado.

Tentativas têm sido feitas também no sentido de uma padronização da metodologia para avaliação da atividade da enzima nitrogenase presente na alga *Anabaena azollae*. Da dos contraditórios encontrados na literatura, podem ser devidos à utilização de diferentes metodologias, muitas delas passíveis de erros.

Preliminarmente à uma otimização da produção da *Azolla* e a estudos econômicos relativos à minimização de insumos que o uso da associação pode trazer à cultura do arroz, há a necessidade de se estabelecer taxas de recuperação e de se quantificar o nitrogênio proveniente do uso de *Azolla* que seria de fato aproveitado pela cultura. O uso do nitrogênio-15 é tido como importante ferramenta na obtenção de respostas quanto à viabilidade da utilização da *Azolla* como adubo verde sob nossas condições.

Após um delineamento das características agronomicas desejáveis da associação *Azolla-Anabaena*, um programa de melhoramento básico poderá ser estabelecido para selecionar as espécies portadoras dessas características.

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de algumas informações básicas sobre o complexo simbiótico *Azolla-Anabaena azollae* em condições controladas de casa-de-vegetação. Desse modo, relacionou-se fatores ambientais como pH, luz, temperatura, fontes e doses de nitrogênio com o desenvolvimento e a atividade da nitrogenase da *Azolla*.

Estudou-se também uma metodologia adequada para a medida da atividade enzimática e através da utilização da *Azolla* marcada com  $^{15}\text{N}$ , foram obtidas taxas de recuperação do N proveniente da *Azolla* pela cultura do arroz.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Azolla*: uma apresentação

*Azolla* é uma pteridófita aquática, flutuante, originalmente nativa da Ásia, África e das Américas. As espécies de *Azolla* são comumente encontradas em lagos, tanques, campos arroyzeiros e outros ecossistemas aquáticos. Graças à ação do homem, animais e outros meios naturais de dispersão, a *Azolla* tem hoje uma larga distribuição em regiões tropicais e temperadas (Figura 1). Algumas das espécies adaptam-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, enquanto outras desenvolvem-se tanto em condições de clima tropical como temperado. (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Botânicos do mundo todo têm, há muitos anos, demonstrado especial interesse pela *Azolla*, devido ao fato desta planta normalmente viver em relação simbiótica com uma cia

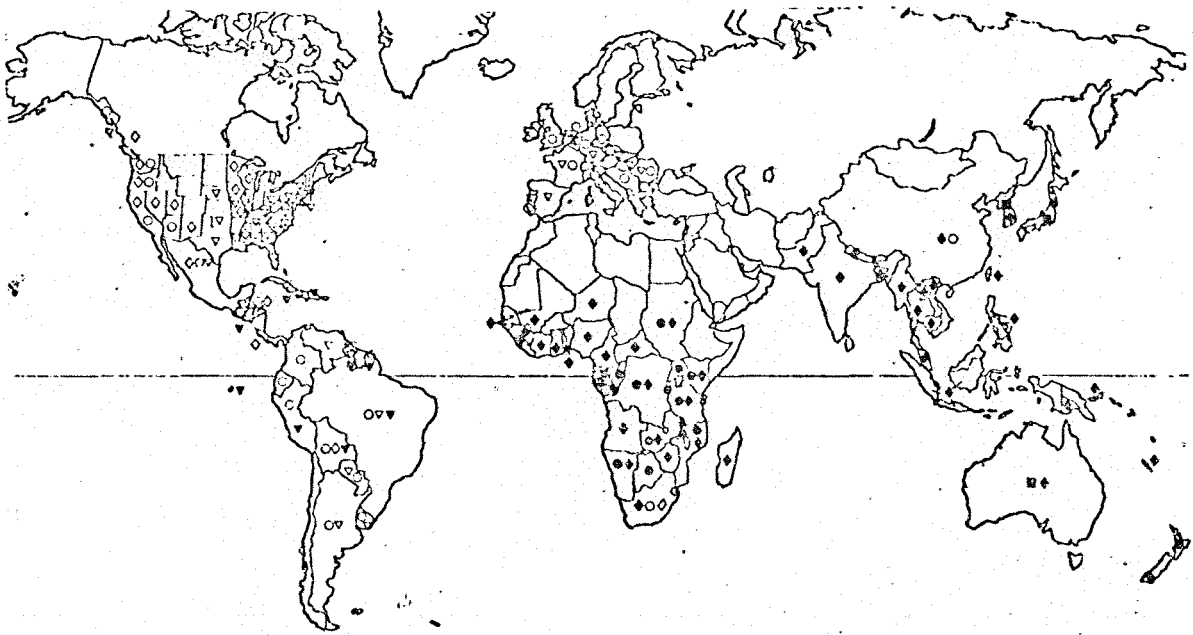


Figura 1 - Distribuição das espécies de *Azolla* (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

- ▽ *A. caroliniana*
- *A. filiculoides*
- ◇ *A. mexicana*
- ▼ *A. microphylla*
- *A. nilotica*
- ◆ *A. pinnata* e *A. imbricata*
- *A. rubra*

nobactéria, fixadora de nitrogênio, *Anabaena azollae*, o que dá ao sistema a capacidade de um perfeito desenvolvimento, em meios onde há ausência de fonte de nitrogênio.

Strásburger, em 1873 (citado por MCORE, 1969), já havia observado essa associação, constatando a presença da cianobactéria *Anabaena azollae*, situada nos lóbulos, dorsais da *Azolla*. Posteriormente, autores como OES (1913); SAUBERT (1949), MOORE (1969); BECKING (1976) e ASHTON e WALMSLEY (1976), evidenciaram ser este sistema fixador de nitrogênio.

PETERS e MAYNE (1974a), separaram a alga da planta, observando que somente esta última desenvolvia-se em ambiente com N-combinado, e que isolada, a *Anabaena* não mais fixava o nitrogênio, perecendo.

Stewart (citado por BECKING, 1976) verificou que a associação simbiótica no sistema fixador era caracterizada pelo fornecimento de carboidratos à alga pela planta, que recebia, em troca, todo o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento.

Recentemente, *Azolla* tem merecido estudos mais aprofundados nos países em desenvolvimento, devido ao seu alto potencial de utilização como adubo verde, em culturas agrícolas desenvolvidas sob condições de irrigação por inundação, especialmente no arroz, uma vez que, com esta finalidade ela já vem sendo usada, há séculos, na China e no Vietnã. WATANABE *et alii* (1977) mostram o elevado potencial que a planta oferece, para aumentos na produção de arroz, funcionando como

uma excelente alternativa para a substituição do fertilizante nitrogenado, com um custo comparativamente baixo.

Segundo LUMPKIN e PLUCKNETT (1982) sob condições de campo adequadas, *Azolla* pode dobrar seu peso cada 3-5 dias e fixar nitrogênio atmosférico numa taxa que em muito excede aquela da relação simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Pode acumular de 2 a 4 ou mais kilogramas de N/ha.dia (equivalente a 10-20 kg de sulfato de amônia).

Como a relação C/N da *Azolla* é relativamente baixa (7:1 a 18:1), apresenta uma rápida decomposição, quando incorporada ao solo. O composto húmico resultante dessa incorporação, além de funcionar como fonte de nutrientes, influencia algumas propriedades físicas e químicas do solo, aumentando a capacidade de retenção de água, promovendo a aeração, a drenagem, uma melhor agregação das partículas do solo, com efeitos benéficos na CTC (FAO SOILS BULLETIN, 1978).

### 2.1.1. Biologia

O nome *Azolla*, proveniente do grego *Azo* (se-car) e *Ollyo* (matar), designa um gênero de plantas de habitats aquáticos e semi-aquáticos, que na classificação taxonomica está agrupada no gênero *Salvinia*, ordem Salviniales, na família monotípica *Azollaceae*. O Quadro 1 nos mostra um sumário de classificação taxonomica dessa planta.



Quadro 1 - Sumário de classificação taxonômica da *Azolla*  
(LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

DIVISÃO	Pteridófitas	
CLASSE	Filicopsida	
ORDEM	Salviniales	
FAMÍLIA	Azollaceae	
GÊNERO	<i>Azolla</i>	
SECÇÃO	<i>Azolla</i>	<i>Rhizosperma</i>
ESPÉCIES	<i>A. caroliniana</i>	<i>A. nilotica</i>
	<i>A. filiculoides</i>	<i>A. pinnata</i>
	<i>A. mexicana</i>	
	<i>A. microphylla</i>	
	<i>A. rubra</i>	
VARIEDADES		<i>A. pinnata</i> var. <i>Imbricata</i>
		<i>A. pinnata</i> var. <i>Pinnata</i>

*Azolla* é constituída de pequenas folhas verdes flutuantes, alternadas, sobrepostas, compostas e pinadas, que recobrem o caule e os ramos. Os folíolos contêm dois lóbulos: um ventral e um dorsal. O lóbulo dorsal é aéreo, clorofilado e espesso, contendo uma concavidade. O lóbulo ventral é sub-

merso, aclorofilado e fino (ASHTON e WALMSLEY, 1976; PETERS, 1978 a).

Nos lóbulos dorsais das folhas, dentro das cavidades dos folíolos está presente a alga *Anabaena Azollae* (Figura 2), que vive no microambiente proporcionado pelo meristema apical da folha da *Azolla*, não sendo, normalmente, encontrada em vida livre (ASHTON e WALMSLEY, 1976; LAMBORG, 1977).

*Anabaena azollae* é pertencente ao grupo de cianobactéria, que é o nome utilizado atualmente para designar as algas anteriormente denominadas cianofíceas (STANIER *et alii*, 1971).

As cianobactérias compreendem o único grupo dentro das algas em que ocorre espécies fixadoras de nitrogênio. Estes microrganismos procariotos fotossintéticos contêm pigmento como clorofila a, carotenos, xantofilas e ficocianina, que em combinação produzem a cor azul esverdeada característica do grupo (STEWART *et alii*, 1978).

A morfologia das cianobactérias é bastante variada: encontram-se desde as mais simples, unicelulares, até as mais complexas, que são ramificadas com filamentos multiseriados. A célula tem uma forma bem definida, cercada por firme parede celular e frequentemente envolvida numa camada de mucilagem, sendo que nas células filamentosas, a estrutura viva encontrada dentro dessa camada é denominada tricoma.

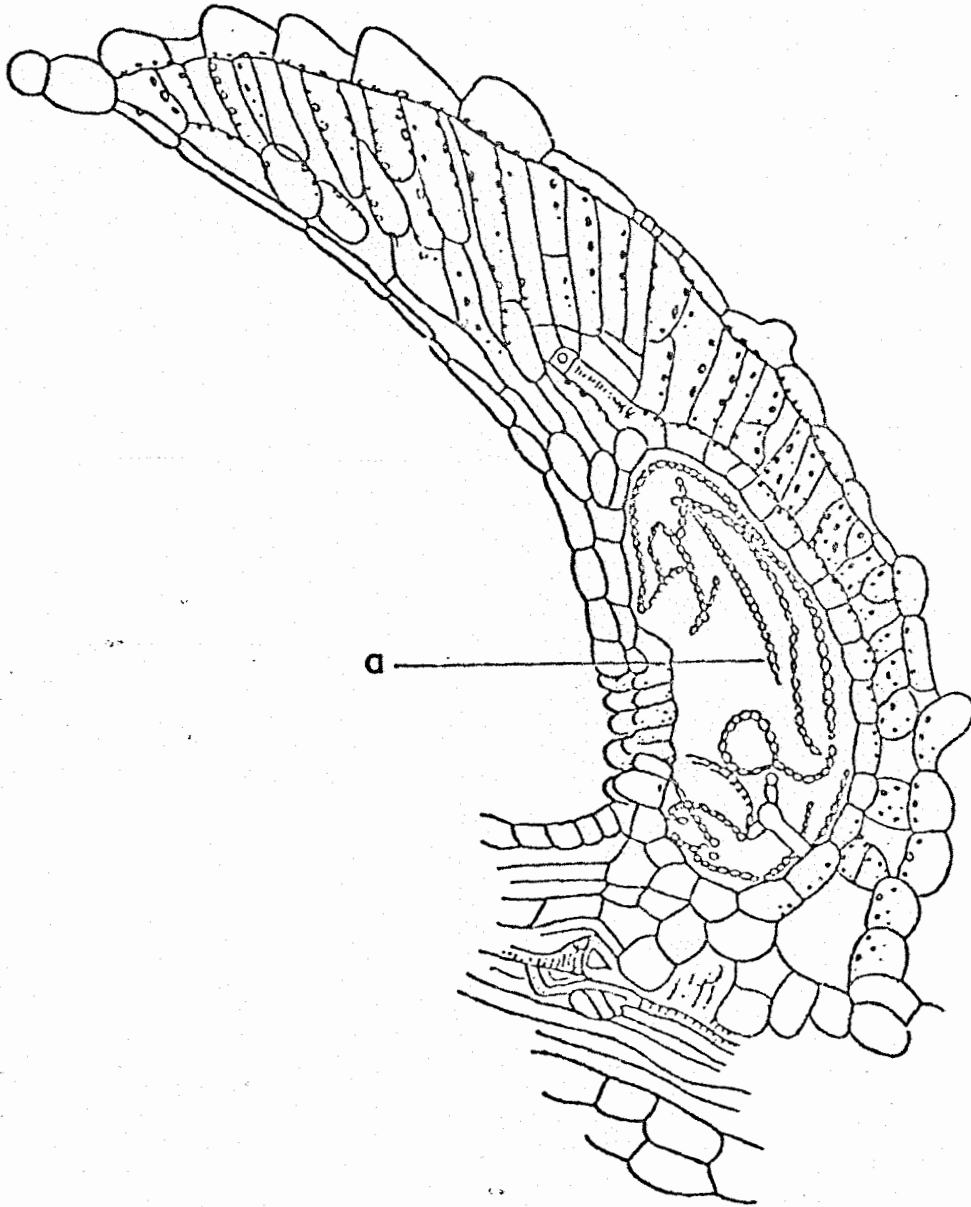


Figura 2 - Corte transversal do lóbulo superior da folha.  
a) filamentos de *Anabaena*.



## 2.2. Fisiologia

As informações a respeito dos processos vitais, composição e fatores ambientais que afetam o complexo simbiótico *Azolla-Anabaena* são ainda bastante limitadas (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982). Muitas questões fundamentais sobre a fisiologia e a bioquímica da simbiose permanecem sem resposta, particularmente em relação a específicos caminhos metabólicos níveis enzimáticos e controle da simbiose, bem como da relação desses com os fatores ambientais. Além disso, os conhecimentos que se tem ainda hoje sobre quase todos os aspectos da alga simbiote *Anabaena* não podem ser chamados de satisfatórios.

De acordo com MOORE (1969), fatores que levam a uma continuidade da existência dessa associação é um enigma pois é improvável que a infecção através da água, que é casual, seja responsável pela quase invariável presença da alga, uma vez que o lóbulo superior da folha não está em contato direto com a água e, muito dificilmente é umedecido.

### 2.2.1. Crescimento

Como uma planta aquática flutuante, que se reproduz vegetativamente através de fragmentação, *Azolla* é capaz de manter uma taxa de crescimento exponencial, quando mantida em ótimas condições. (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982). Experi

mentos de WATANABE *et alii* (1977), mostram que, quando desenvolvida em solução nutritiva, com um balanço adequado de nutrientes, *Azolla* dobrou sua massa num período de 3 a 5 dias, durante a primeira semana de desenvolvimento, após a inoculação. PETERS *et alii* (1980a), utilizaram espécies de *Azolla* de rápido crescimento vegetativo (*A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana* e *A. pinnata*), observando que, em condições ótimas, em laboratório, elas foram capazes de dobrar a biomassa em 2 dias, ou até menos.

Sob condições naturais, esse crescimento vegetativo extremamente rápido pode, segundo PETERS e CALVERT (1983), torná-las ou uma cultura com potencial extremamente alto, ou uma planta daninha totalmente indesejável. Tudo depende do local onde esse desenvolvimento ocorre.

PETERS e MAYNE (1979), numa análise dos fatores de crescimento da *Azolla*, asseguram que o crescimento é dependente do ar, luz, água e elementos minerais, com exceção do N mineral, uma vez que todo nitrogênio necessário à *Azolla* provém da fixação do  $N_2$  atmosférico, pela *Anabaena*.

A curva de crescimento da *Azolla*, quando em condições controladas favoráveis, apresenta-se como uma curva logística (sigmóide), que pode ser decomposta em duas fases: a fase exponencial, que caracteriza-se pelo tempo requerido para dobrar a biomassa. De acordo com as informações disponíveis na literatura, em condições de campo, esse tempo situa-se por volta de 3 - 10 dias (VAN HOVE e LOPEZ, 1983).

A outra fase seria a chamada "limitante", quando há o aparecimento progressivo de um fator limitante; o primeiro a surgir seria concernente à superfície disponível. Começa por um período no qual o incremento diário da biomassa é quase constante e prossegue até que a densidade populacional corresponda a um recobrimento correspondente a um índice de área foliar de 4%. Em condições favoráveis, esse período dura aproximadamente 10 dias. Segue-se então um período durante o qual o crescimento diminui cada vez mais. Isto se explica porque as plantas situadas na superfície do "tapete" de *Azolla* no campo mostram, gradativamente, deficiência hídrica, e às vezes um déficit de nutrição; suas raízes dificilmente atravessam as camadas superpostas de *Azolla*, enquanto que as plantas situadas nas camadas mais abaixo vão recebendo cada vez menos luz. Por fim, o crescimento torna-se nulo, depois negativo e a população começa a morrer.

### 2.2.2. Composição

Um peso da matéria seca que varia de 4,8% a 7,7% do peso da matéria fresca tem sido reportado para as espécies de *Azolla*, por autores como MOORE (1969); BUCKINGHAM *et alii* (1978); PETERS *et alii* (1980a). PETERS e CALVERT (1983) relatam que há numerosos dados não publicados sobre relação peso da matéria seca/peso da matéria fresca para as quatro espécies por eles estudadas (*A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A.*

*mexicana* e *A. pinnata*), onde valores de 6,02% e 1,02% foram alcançados.

Muitas vezes o peso de matéria seca é calculado através de multiplicação do peso da matéria fresca pela % de matéria seca de uma pequena subamostragem. Torna-se um problema o cálculo correto da relação peso da matéria seca / peso matéria fresca da *Azolla*, uma vez que não há uma padronização nos métodos de remoção da água aderida à superfície das plantas.

Embora a matéria seca normalmente contenha de 3-6% de nitrogênio (MOORE, 1969; TALLEY e RAINS, 1980; TALLEY *et alii*, 1977; WATANABE *et alii*, 1977), esse teor é extremamente influenciado pelas condições de crescimento.

TALLEY e RAINS (1980), encontraram, em espécies de *Azolla*, 30 valores para teor de N, variando de 2,2% a 5,6%, em função da variação das intensidades luminosas e dos regimes de temperatura noite/dia.

LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), afirmam que o teor de nitrogênio da *Azolla* é normalmente na faixa de 3,5-4,0%. Ainda segundo esses autores, em condições de cultivo normal, os fatores que mais influenciam o teor de N na planta são a disponibilidade de fósforo e a temperatura.

De acordo com WATANABE *et alii* (1977), a relação C/N da *Azolla* afeta a taxa de decomposição da planta quando incorporada ao solo. São relatados valores de 7:1 a 8:1 para *Azolla* (PETERS, 1977); PETERS *et alii*, 1980a; PETERS e CALVERT, 1983).



Experimentos de campo conduzidos na China por LUMPKIN e autores chineses, mostraram valores da relação C/N de 8,3:1 a 13,5:1 para várias espécies de *Azolla* (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982). Os teores de C da matéria seca da *Azolla* não apresentam grandes variações entre os trabalhos, variando sempre de 41,5 a 45,3% (PETERS e CALVERT, 1983).

O teor de proteína da *Azolla* fica entre 13 a 30%, com base em seu peso seco (NEWTON e CAVINS, 1976; VARGHESE *et alii*, 1976; BUCKINGHAM *et alii*, 1978; SINGH, 1979). Análises de aminoácidos livres da planta e ensaios com ratos indicaram que, deficiência nos teores de lisina, metionina e histidina, além do alto teor de minerais, e baixo grau de digestibilidade, contribuem para que *Azolla* não possa se prestar como fonte única de alimentação aos animais.

De acordo com VARGHESE *et alii* (1976); BUCKINGHAM *et alii*, (1978); FUGIWARA *et alii* (1947) e SHI-SU-LIAN *et alii*, (1978) (os dois últimos citados por LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982), as porcentagens dos outros elementos constituintes da *Azolla* são: celulose: 5,6 - 15,2; hemicelulose: 9,76 - 17,9; lignina 9,3 - 34,8; cinzas: 9,7 - 23,8; gorduras 4,4 - 6,3; fibras detergentes ácidas 26,6; fibras detergentes neutras 39,2.

### 2.2.3. Fotossíntese

A simbiose se caracteriza pelo fato de os 2 simbiontes serem fotoautotróficos; com metabolismo fotossintético do tipo  $C_3$  (VAN HOVE e LOPEZ, 1983). De acordo com PETERS *et alii* (1979), os pigmentos responsáveis pela captura luminosa dos dois indivíduos (*Azolla* e *Anabaena*), são complementares. A *Azolla* contém clorofila "a" e "b" enquanto a alga contém clorofila a e ficobilina. Ambos contêm carotenóides. Segundo diversos autores (PETERS e MAYNE, 1974a; RAY *et alii*, 1978; PETERS *et alii*, 1979), a alga contribui com 15 a 20% do total de clorofila da associação.

A fotossíntese feita pela *Anabaena* não é inibida pelo  $O_2$  atmosférico e o ponto de compensação situa-se em torno de 4 ppm de  $CO_2$ , tanto a 20% como a 2% de pressão parcial de  $O_2$ . Embora estudos com a *Anabaena* isolada das cavidades da folha tenham demonstrado sua fisiologia, esses estudos não as extrapolaram, necessariamente, ao estado simbiótico.

Estima-se que a *Anabaena* contribui em cerca de 6% a 10% do total da capacidade fotossintética da associação (KAPLAN e PETERS, não publicado, citado por PETERS e CALVERT,

1983).

VAN HOVE e LOPEZ (1983), estudando o fator luz, relatam que a fotossíntese na associação, se satura a cerca de 20.000 lux, e não diminui até valores de 100.000 lux, sendo que o fotoperíodo pouco influencia a atividade fotossintética e o crescimento aumenta ainda que não linearmente com a duração da iluminação. O máximo se alcança com o regime de iluminação contínua.

Segundo PETERS e CALVERT (1983), na *Anabaena*, como ocorre com as cianobactérias em geral, a quantidade de fotossintatos produzida é maior na faixa de luz que vai de 580 - 640 nm, que é a região de absorção da ficobilina. Prosseguindo, esses mesmos autores constataam que os espectros de ação da fotossíntese na associação e na *Azolla* são muito similares um ao outro, e a outras plantas verdes, com o máximo "quantum" produzido ocorrendo entre 650 e 670 nm.

BECKING e DONZE (1981), puderam diferenciar capacidades fotossintéticas entre os simbiotes presentes em 3 espécies de *Azolla* (*A. pinnata*, *A. caroliniana* e *A. filiculoides*). Havia diferenças na composição dos pigmentos e na atividade da nitrogenase entre cianobactérias das espécies de *Azolla*. Há indícios da superioridade do simbiote da *Azolla pinnata*.

Sugerem esses autores que, através da seleção, cultivares mais eficientes fotossinteticamente podem ser obtidas e, futuramente, através de técnicas mais avançadas como

mutação e manipulação genética, poderão ser utilizados clones mais eficientes para a agricultura.

#### 2.2.4. Fixação do Nitrogênio pela *Anabaena*

O fato da simbiose *Azolla-Anabaena* reduzir nitrogênio atmosférico à amônia através da enzima nitrogenase, tem permitido que a associação sobreviva competitiva e satisfatoriamente em meios isentos de nitrogênio. Mesmo quando desenvolvida em meio contendo nitrogênio, uma parte do nitrogênio total requerido pela associação será proveniente da água, sendo a outra porção fixada do N atmosférico, pela alga *Anabaena* (NEWTÓN e SELKE, 1981). Ao contrário do que ocorre com a simbiose leguminosa-*Rhizobium*, a atividade da nitrogenase da *Anabaena* não cessa quando submetida a longos períodos com concentrações adequadas ou excessivas de nitrogênio combinado no meio (PETERS, 1978b).

A redução do  $N_2$  a amônia, é catalizada pela nitrogenase a qual consiste de duas diferentes proteínas (1 Molibdênio-Ferro proteína e 1 ferro-proteína), que são desativadas pela ação do oxigênio. Como *Anabaena* reduz nitrogênio em condições atmosféricas normais, supõe-se que o sítio de fixação de N sejam os heterocistos presentes na alga, que têm a capacidade de proteger a enzima nitrogenase tanto do oxigênio atmosférico quanto do oxigênio intracelular, produzido pela

fotossíntese, (PETERS e CALVERT, 1983). Segundo PETERS (1975), o fato de não haver fixação de  $\text{CO}_2$  nos heterocistos da alga *Anabaena* confirma esta hipótese.

O simbiote *Anabaena* pode suprir seu hospedeiro *Azolla* com todo o nitrogênio requerido pela pteridófito, ou até mais que o necessário para a associação. Estudos realizados por PETERS *et alii* (1980b) revelaram que *Anabaena*, quando isolada e incubada em meio de cultura, exuda quantidades superiores a 50% de seu N fixado na forma de amônia. Esta observação levou a estudos sobre as enzimas presentes na *Anabaena* e na *Azolla*, que estariam envolvidas na assimilação da amônia. Resultados encontrados mostraram que ambos os organismos são capazes de assimilar amônia via as enzimas glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase (RAY *et alii*, 1978).

#### 2.2.4.1. Acúmulo de nitrogênio pelo complexo simbiótico.

Os dados de acúmulo de N pela *Azolla* são, em geral, bastante concordantes dentro da literatura especializada. LUMPKIN e PLUCKNETT (1982) citam trabalhos de LUMPKIN, desenvolvidos juntamente com pesquisadores chineses, onde taxas de acumulação de nitrogênio, pela *Azolla filiculoides*, foi relatada como sendo de 10,5 kg N/ha dia, enquanto a matéria verde era de 36,3 t/ha, com um tempo de 4,8 dias para dobrar

a produção de massa.

TALLEY e RAINS (1980), reportam uma taxa de 2,7 kg N/ha dia sob condições de campo, e WATANABE *et alii* (1980), calcularam uma média diária de 1,4 kg N/ha dia. Essas taxas significativamente menores, poderiam ser devidas a diferenças no cálculo com base na produção de massa verde, através de médias de longos períodos de acúmulo e não terem sido fornecidas condições ótimas para o desenvolvimento da *Azolla*.

Experimentos sob condições de casa de vegetação, realizados por WATANABE *et alii* (1977), indicam taxas de acúmulo de N da ordem de 7,8 mg N/peso seco, por dia. Ainda nesse trabalho, encontrou-se taxa de 1,1 kg N/ha dia, quando *Azolla* foi avaliada em condições de campo.

Segundo o Boletim de Solos da FAO (1978), a simbiose *Azolla-Anabaena* pode produzir  $10^3$  kg de massa verde/ha/dia, contendo 3 kg de nitrogênio fixado, o que equivale a 15 kg de sulfato de amônio, ou 7 kg de uréia.

Estima-se que, nos países em desenvolvimento, através do cultivo de *Azolla*, poder-se-ia produzir 1,5 tonelada de nitrogênio/ha/cultura de arroz inundado.

Porém, esse acúmulo de massa verde e de nitrogênio está, obviamente, ligado a quantidade de inóculo inicial de *Azolla* aplicado ao campo. De acordo com o Boletim de Solos da FAO (1978), começa-se o cultivo com 3 toneladas de *Azolla* (peso da matéria fresca)/hectare (muitas vezes, essa quantidade é remanescente de uma cultura prévia da Pteridófita no local). Partin-

do-se desse inóculo, consegue-se, através de aproximadamente 10 colheitas num período de 3 a 4 meses, uma produção de, aproximadamente, 160 ton/ha, que contém cerca de 425 kg de N/ha (equivalentes a mais de 2 toneladas) de sulfato de amônio, ou, cerca de uma tonelada de uréia

MALAVOLTA *et alii* (1981), indicam que, de acordo com as taxas de fixação de N estimadas pelo método da redução de acetileno, o acúmulo de N fixado, está em torno de 100 a 600 kg N/ha/ano e que a maior parte deste N só é disponível após morte e decomposição das plantas.

Trabalhos de WATANABE (1978), mostram que, coletando-se *Azolla*, de parcelas no campo, houve ganhos no teor de N, que totalizaram 465 kg/ha, num período de 335 dias, atingindo uma média de 1,4 kg de nitrogênio/ha/dia.

TALLEY e RAINS (1980), conduziram experimentos de campo na Califórnia, durante a primavera, quando se considera que as condições ambientais sejam condizentes com as exigências da *Azolla* quanto ao meio ambiente. Inoculou-se 50 g peso da matéria fresca/m<sup>2</sup> de *A. filiculoides* (o que representa 1,5 kg N/ha) em um campo inundado. Este inóculo cobria menos de 10% da superfície da água, mas, em 15 dias havia tomado 100% da área, aumentando o teor de nitrogênio em aproximadamente 9 vezes. A média de produção e acúmulo de nitrogênio foi de 2,5 kg/ha/dia, nos próximos 10 dias do experimento. Este aumento foi paralelo a um significativo aumento na atividade da nitrogenase, medido pela técnica de redução do acetileno. Após 35 dias

da inoculação, as plantas de *Azolla* constituíam uma biomassa de 1700 kg/ha (em peso da matéria seca), os quais continham 52 kg/ha de nitrogênio.

#### 2.2.5. Relação fotossíntese - Fixação do N<sub>2</sub>

A fotossíntese é, definitivamente, a fonte de todos os redutores e do ATP para a atividade da nitrogenase nessas associações. (PETERS e CALVERT, 1983; PETERS *et alii*, 1979). A atividade da nitrogenase em *Azolla caroliniana* é máxima numa combinação de condições luminosa e aeróbica e negligível, quando em condições de ausência de luz e O<sub>2</sub> (PETERS e MAYNE, 1974 b; NEWTON, 1976; PETERS *et alii*, 1976). Também para *Azolla filiculoides* tem sido demonstrada a dependência da luz para a atividade da nitrogenase (WALMSLEY *et alii*, 1973; HILL, 1977). HOLST e YOPP (1976) e BECKING (1976), afirmam o mesmo para, respectivamente, *A. mexicana* e *A. pinnata*.

A atividade da nitrogenase em condições escuras e aeróbicas depende das reservas de fotossintatos resultantes da fotossíntese, que são utilizados como fontes de redutores (PETERS e CALVERT, 1983). Esta dependência é demonstrada variando-se a duração dos períodos aeróbicos, claros ou escuros, antes do ensaio, para manter ou diminuir as reservas endógenas. Trabalhos de PETERS (1975), medindo-se as taxas da atividade da redução do acetileno sob condições aeróbicas, e



ausência de luz, versus condições aeróbicas, luminosas, porém com a utilização de um inibidor da fotólise da água na fotossíntese, encontraram menores taxas em condições aeróbicas, no escuro. Este fato mostra que, em condições aeróbicas e em ausência de luz, a atividade da nitrogenase tem como fator limitante principal o fornecimento do ATP.

De acordo com STEWART (1978), após ponderações a respeito do assunto, é difícil aceitar que, nas cianobactérias fixadoras de nitrogênio, a fotólise da água constitua-se diretamente na principal fonte de redutores para a nitrogenase. Se se assume que os redutores são gerados, independentemente, no escuro e sob luz, então, os aumentos na atividade da enzima, sob luz, são atribuídos necessariamente ao ATP gerado fotossinteticamente (PETERS e CALVERT, 1983). Embora a atividade do fotossistema II seja requerida para fornecer fotossintatos via fixação do  $\text{CO}_2$ , não é diretamente necessário para a atividade da nitrogenase. Resultados de SHI-DING-JI *et alii* (1981), vêm de encontro a essa afirmação, estudando *A. imbricata*.

Resultados de um grande número de estudos (PETERS e MAYNE, 1974b; PETERS, 1975; PETERS *et alii*, 1976; PETERS *et alii*, 1980b), afirmam que redutores fornecidos pela fotossíntese e a fotofosforilação cíclica são as forças que regem a atividade da nitrogenase. A interação da fotossíntese com a fixação do nitrogênio, também tem sido demonstrada pela obtenção do espectro de ação para a reação de redução do acetileno catalizada pela enzima nitrogenase, na associação e na *Anabaena*, isolada-

mente (TYAGI *et alii*, 1981). As ficobiliproteínas são consideradas pigmentos acessórios para o fotossistema II e, são ausentes ou presentes em pouca quantidade nos heterocistos. Porém, os heterocistos podem reter esses pigmentos, que absorvem energia luminosa dentro do espectro visível mínimo efetivamente utilizado pelos pigmentos da *Azolla*, essa energia é capturada para ser usada na redução do acetileno.

#### 2.2.6. Transferência do N fixado, da *Anabaena* a *Azolla*

A *Anabaena* tem a capacidade de fornecer todo o nitrogênio requerido pela associação. A alga, presente nas cavidades das folhas maduras, libera  $N_2$  fixado na forma de amônia a qual é rapidamente assimilada pela *Azolla* (PETERS e CALVERT, 1983). VENKATARAMAN (1980) verificou que, um isolado de *Anabaena azollae* de *Azolla pinnata* crescida em  $N_2$ , liberou 25% do nitrogênio fixado, num período de 30 dias, sendo que, experimentos preliminares indicaram que o nitrogênio liberado era na forma de amino-ácidos.

ASHTON e WALMSLEY (1976), isolando o simbiote de *A. filiculoides*, e PETERS *et alii* (1976), trabalhando com *Anabaena* presente na *A. caroliniana*, verificaram que ambas liberaram amônia no meio da cultura, e a capacidade de fixar  $N_2$  não foi afetada por altos níveis de nitrogênio combinado no meio. Em estudos utilizando  $^{15}N_2$ , o simbiote de *A. caroliniana* remo-

veu diretamente da camara das folhas, aproximadamente metade do  $N_2$  fixado, predominantemente como amônia (PETERS, *et alii*, 1977; PETERS *et alii*, 1979).

PETERS *et alii* (1979) relatam que, a média de distribuição da amônia extra e intracelular é de 35% e 8% do N total, e a distribuição de nitrogênio orgânico foi encontrada como sendo de 7% do N total para extracelular e 51% para intracelular. Em alguns experimentos porém, a amônia extracelular representou mais da metade do nitrogênio fixado.

NEWTON e CAVINS (1976), asseguram que amônia representa 50% do N total da associação e que são encontrados por volta de 550 nmol de amônia microdifusa/grama de material vegetal, com base em seu peso fresco. Assumindo-se que a associação possui 3% em nitrogênio, baseados em seu peso seco, o nitrogênio microdifuso, na forma de amônia, significa aproximadamente 0,6% do N-total. Assim, amino-ácidos livres constituem significativa porção do N total.

PETERS *et alii* (1979), usando extração por etanol e digestão pelo método Kjeldahl encontraram taxas de 650 a 1200 nmoles de amônia/g de tecido (peso da matéria fresca), ou seja, menos de 1% do N total, e de 5 a 6% de N solúvel em etanol. Estes dados indicaram que a amônia liberada pelo simbiote é a principal fonte de N para a associação crescida sob condições de fixação de  $N_2$  e que esta é rapidamente assimilada pela *Azolla*.

### 2.3. Fatores Ambientais

Muitos estudos têm sido feitos sobre como o meio ambiente pode influenciar o desenvolvimento da associação simbiótica *Azolla Anabaena*, porém, os conhecimentos deles advindos, dificilmente conduzem a uma generalização, válida para as diversas espécies de *Azolla* e suas interações com os diferentes habitats. Segundo FIORE (1984a), isto se deve as seguintes razões: a) as interações entre os diversos fatores do meio são múltiplas, e as comparações dos resultados obtidos pelos autores são, conseqüentemente, difíceis. b) Constata-se que a *Azolla* requer um período de aclimação às vezes prolongado, quando transferida de um meio para o outro, e há falta de informações sobre o período de pré-tratamento e c) há numerosas conclusões a título geral quando é evidente que existem diferenças de comportamento a nível específico, varietal ou clonal.

De todos os fatores ambientais, o que pode ser considerado mais limitante é, obviamente, a disponibilidade de água, pois, embora *Azolla* possa sobreviver em condições de solo úmido, é uma pobre competidora contra moléstias terrestres, principalmente certos fungos (FIORE, 1984a). Outros fatores importantes são: disponibilidade de nutrientes, luz e aspectos da qualidade da água, como pH, salinidade e turbulência.

### 2.4.1. Requerimentos nutricionais

#### a) Nitrogênio

Em campos onde há a exigência de altas quantidades de fertilizante nitrogenado, *Azolla* pode ser cultivada com nitrogênio químico no meio. WATANABE *et alii* (1981), examinaram os efeitos do fertilizante nitrogenado sobre a simbiose *Azolla-Anabaena*, e concluíram que, após 24 horas de exposição a uma fonte nitrogenada na solução nutritiva, a atividade da nitrogenase não foi muito afetada, mesmo sob altas concentrações de nitrogênio, enquanto que, após 4 dias desenvolvendo-se em meio com N, a atividade sofreu uma queda para aproximadamente metade de seu valor normal.

Em outros trabalhos, realizados por WATANABE *et alii* (1977), observou-se que quando desenvolvida em meio com N, *Azolla* teve uma menor produção de massa fresca (talvez devido ao grande desenvolvimento de algas verdes, o que proporcionou pouco espaço físico para o crescimento da *Azolla*) porém, manteve uma atividade de redução do acetileno bastante regular. Já PETERS *et alii*, (1981), constatam que a presença de N-combinado afetou a atividade da redução do acetileno porém, não se constitui como fator negativo para o crescimento da biomassa.

Muitas contradições sobre a inibição, ou não, da atividade da nitrogenase na simbiose em presença de N-com-

binado ainda são encontradas na literatura. STEWART *et alii*, (1968), FIORE e RUSCHEL (1981) e YATAZAWA *et alii*, (1980), indicam que a inibição da nitrogenase é devida à presença de N-químico no meio, enquanto que BONE (1972) encontrou apenas uma inibição parcial, ou um decréscimo muito pequeno na atividade.

FIORE e RUSCHEL (1981), estudaram a influência de diferentes fontes de N, em solução nutritiva, encontrando que nitrato deprecia drasticamente a atividade da nitrogenase seguindo-se a esta fonte, como outros inibidores da enzima, o sulfato de amônio e a uréia. Esses resultados vão de encontro aos de PETERS e MAYNE (1974a,b), que afirmam serem nitrato e uréia inibidores da atividade de redução do acetileno em até 30%.

WATANABE *et alii* (1981) acompanharam simultaneamente a assimilação de N combinado e a fixação de  $N_2$ , com uso de  $^{15}N$ . Encontraram que, a 10 mM de  $N-NH_4$ , 61% do nitrogênio da *Azolla*, era originário do N-combinado do meio, 30% era proveniente do  $N_2$ .

Resultados opostos atingiram FIORE *et alii* (1979), usando  $^{15}NO_3$  acrescido à solução nutritiva onde desenvolvia-se *Azolla*: concluíram que aproximadamente 66% do nitrogênio presente advinha da fixação, e 34% do  $N-NO_3$  presente na solução nutritiva. NEWTON e SELKE (1981), reportaram a inibição da fixação de nitrogênio, em presença de N-combinado (amônia), podendo entretanto ser restaurada, a altos níveis, após a transferência das plantas para meios livres de N.

PETERS e ITO (1984), sugere que o uso de soluções nutritivas acrescidas de N-combinado e técnicas de  $^{15}\text{N}$  para demonstrar a habilidade de várias espécies de *Azolla* em fixar  $\text{N}_2$  e absorver N do meio simultaneamente, são evidências da necessidade de substituição das técnicas que se utilizam de aumentos no N-total da planta pelas técnicas acima citadas como parâmetro para avaliar fixação de  $\text{N}_2$ .

Segundo LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), devido à capacidade que tanto a *Azolla* quanto *Anabaena* têm em assimilar o nitrogênio do meio, muitas vezes, a presença de N-combinado pode ser benéfica; por exemplo, em temperaturas extremamente baixas ( $15^\circ\text{C}$ ), quando a fixação do N tornar-se insuficiente para a sobrevivência da *Azolla*.

#### b) Outros nutrientes

Entre os elementos minerais, fósforo é, normalmente, o mais limitante ao desenvolvimento da *Azolla*. Assegura-se que *Azolla* pode manter um teor de 3,6% de N e mais de 0,23% P (peso da matéria seca), embora possa absorver até 1,59% P, através do "consumo de luxo". Este fato demonstra que *Azolla* pode estocar aproximadamente 6 vezes a quantidade de P normal e suficiente para seu crescimento e fixação de nitrogênio e este fato deve ser considerado quando se tenta adotar *Azolla* num

sistema de cultivo de arroz. (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Estudos têm sido feitos buscando valores para a concentração mínima de P requerida pela *Azolla*. YATAZAWA, *et alii* (1980), observaram que níveis de P menores que 0,03 mmol/l de solução nutritiva, prejudicaram o crescimento e a fixação de N da *Azolla*. SUBUDHI e WATANABE (1979), relatam que concentrações menores que 0,6 ppm de P na solução depreciam crescimento, fixação de N e o teor de clorofila de *A. pinnata*. Plantas deficientes em P desenvolvem raízes enroladas (Cohn e Renlund, 1953, citados por LUMPKIN e PLUNCKNETT, 1982) e podem produzir antocianina, caso esta seja uma característica da espécie.

MALAVOLTA *et alii* (1981) observaram em solução nutritiva isenta de P, clorose começando nas folhas mais velhas e em seguida nas folhas mais novas. As raízes tornaram-se finas, marrom-escuro e facilmente destacáveis.

O potássio é fator limitante em certos solos leves e sugere-se que a deficiência desse elemento intervém na indução da esporulação (FIORE, 1984a). A concentração limite deste elemento para *Azolla* tem sido reportada como cerca de 0,4 mmol/litro (YATAZAWA *et alii*, 1980).

Após P e K, ferro e molibdenio são considerados limitantes para o desenvolvimento da *Azolla* no campo. Ambos os elementos são componentes essenciais da enzima nitrogenase (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Problemas com deficiência de ferro podem sur-



gir em meios neutros ou alcalinos devido à precipitação dos íons fêrricos (OLSEN, 1972). RAINS e TALLEY (1979) reportam uma concentração crítica de Fe, para *Azolla*, na faixa de 20 g Fe/l, um pouco mais baixo que o valor encontrado por YATAZA WA et alii (1980).

As necessidades de Zn são consideradas como ínfimas e não têm sido constatadas deficiências deste elemento em todos os locais onde se cultiva *Azolla* hoje em dia (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Em *Anabaena cylindrica* o Na aparece como essencial e, a partir desse fato, conclui-se que este elemento intervém igualmente no metabolismo da *A. azollae*. Muitos meios utilizados para cultivo de *Azolla* não adicionam esse elemento, que pode ser requerido (traços), uma vez que se observou, em experimentos realizados, estímulo do crescimento quando se utilizou concentrações moderadas de NaCl na solução nutritiva (FIORE, 1984a).

Segundo WATANABE *et alii* (1977), a deficiência em Ca produz uma diminuição no crescimento. A influência de outros elementos essenciais, como Mg, S, B, e Cu no desenvolvimento da *Azolla*, ainda necessitam estudos mais aprofundados.

### 2.3.2. Luz

O crescimento da *Azolla* aumenta em proporção direta ao aumento da intensidade luminosa, até um certo nível, quando então, satura-se. Segundo ASHTON (1974) e TALLEY e RAINS (1980), essa saturação dá-se por volta de aproximadamente 25 a 50% da intensidade solar máxima.

De acordo com VAN HOVE e LOPEZ (1983), deve-se levar em consideração que em condições naturais, *Azolla* está submetida a variações diárias de intensidade luminosa entre 0 e 120.000 lux (2.000  $\mu$  Einstein/m<sup>2</sup>.S) e que os resultados obtidos em condições controladas são dificilmente extrapoladas às condições de campo. Como exemplo, podem ser citadas, espécies de *Azolla* que podem manter altas taxas relativas de crescimento mesmo durante a máxima intensidade luminosa, no Havaí (intensidade de 1700  $\mu$ E/m<sup>2</sup>.S), desde que outros fatores não sejam limitantes. Esta observação é reforçada por RAY *et alii* (1979), que mostrou altos níveis de assimilação de CO<sub>2</sub> pela *Azolla* a 2000  $\mu$ E/m<sup>2</sup>.S.

Em campo, juntamente com arroz, a taxa de crescimento da *Azolla* começa a declinar, devido ao sombreamento exercido pelas plantas de arroz ao redor do 45º dia após o transplante do arroz. Lu *et alii* (1963, citados por LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982) relatam que a taxa de crescimento tem seu declínio começando por volta do 30º dia após o transplante do arroz, quando a luz sob a cultura é reduzida a menos de 50% da

máxima intensidade.

### 2.3.3. pH da água

De todos os aspectos relacionados à qualidade da água de crescimento da *Azolla*, pH é o mais amplamente estudado e provavelmente, o mais limitante. Muitos estudos do pH são conduzidos em vasos, com Fe quelado, não sendo representativos das condições de campo. Os mais graves problemas que o pH do meio pode causar, são aqueles indiretos, ou seja, quando são modificadas as disponibilidades dos elementos minerais, ocasionando toxidez ou deficiências para a cultura (LUMPKIN e PUNCKNETT, 1982).

Considera-se como pH para um ótimo crescimento da *Azolla* em meio de cultura, aquele que se encontra dentro da faixa de 4,5 a 7,0, porém, a associação pode sobreviver dentro dos limites de 3,5 a 10,0 (NICKELL, 1961; ASHTON, 1974; WATANABE *et alii*, 1977; PETERS *et alii*, 1980a). HOLST e YOPP (1979) estudaram efeitos do pH sobre desenvolvimento de várias espécies de *Azolla*, e encontraram que na faixa de pH, compreendida entre 5,0 e 9,0, não houve diferenças significativas nas taxas de crescimento da pteridófito.

WATANABE *et alii*, (1977), utilizando diferentes pHs e concentrações de ferro para *Azolla*, em casa de vegetação, observaram que, a partir de pHs menores que 6,5, as

plantas começaram a tornarem-se amareladas e que, a atividade de fixação de nitrogênio foi mais baixa a um pH 7,5. Encontraram que, o pH ótimo para solução nutritiva seria 5,5 porém, ressaltam os autores, esses são valores tomados sob condições controladas, devendo serem feitos estudos sobre crescimento da *Azolla* em condições naturais de campo.

TALLEY *et alii* (1977) observaram, em condições de campo, que num pH entre 8,0 - 8,5, há a necessidade de uma fonte suplementar de Fe, para o desenvolvimento normal da associação.

#### 2.3.4. Temperatura

Temperatura é, após qualidade da água, o mais importante fator do meio que limitaria o desenvolvimento da *Azolla*, além de ser aquele mais dificilmente influenciado pelo homem (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Embora a distribuição geográfica indique que *Azolla* está adaptada a condições climáticas extremamente variadas (VAN HOVE e LOPEZ, 1983), nas regiões tropicais, a temperatura pode ainda ser considerada como um fator problemático. Uma boa maneira de se contornar a situação seria a seleção de estirpes tolerantes, aliada a alguns melhoramentos possíveis de se fazer no ambiente.

São muitas as diferenças entre as espécies de

*Azolla*, no tocante à tolerância aos extremos de temperatura, porém, em geral, pode-se dizer que a faixa ideal de temperatura para todas as espécies está por volta dos 20°C - 30°C (FIORE, 1984a). Dentro da literatura, tem sido citadas espécies de *Azolla* que podem sobreviver, dentro de períodos variáveis, numa faixa de temperatura de -5°C a 45°C (TALLEY *et alii*, 1977; TALLEY e. RAINS, 1980; PETERS, *et alii*, 1980b).

WATANABE *et alii*, (1977) reportaram que, à temperatura de 31°C, o crescimento da *Azolla* começa a diminuir e, embora não se tenha notado diferenças no peso seco, a *Azolla* apresentava folhas menores e de cor amarelada a medida que a temperatura pasando dos 22°C.

LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), relatam que temperatura pode afetar o teor de nitrogênio e o peso seco da *Azolla*.

Autores como TALLEY e RAINS (1980) e BROTONEGRO e ABDULKADIR (1976), concluem que dentro de certos limites luz e temperatura têm um efeito direto e complementar na atividade da nitrogenase. Há uma grande necessidade de testes pré-condicionadores do material, antes de serem feitas as medidas e tiradas as conclusões, no que tange a experimentos de temperatura e sua influência sobre o desenvolvimento da *Azolla* (BECKING, 1979; TALLEY e RAINS, 1980 e PETERS *et alii*, 1980b).

## 2.4. Medidas da Fixação

A técnica mais comumente utilizada para medir-se a fixação biológica do nitrogênio na associação *Azolla-Anabaena* é a da redução do acetileno, empregada para avaliar-se a fixação em leguminosas. O método tradicional de Kjeldahl, medindo-se o N total acumulado na planta, não pode ser aplicado ao sistema, pela dificuldade de obtenção de plantas controles (*Azolla* isenta de *Anabaena*). Alternativas são propostas usando-se outras plantas aquáticas. Como uma alternativa mais sofisticada tem-se a utilização do  $^{15}\text{N}$ , mais precisa e onerosa. No caso da *Azolla*, críticas têm sido feitas aos métodos empregados nessa avaliação, buscando uma uniformidade na metodologia, o que originaria dados mais próximos da realidade.

### 2.4.1. Redução do acetileno

A técnica da redução do gás acetileno (cromatografia gasosa) é relativamente barata e útil como um indicador da atividade da nitrogenase (PETERS e MAYNE, 1974b; NEWTON, 1976; WATANABE, 1983) e pode ser usada para estimar o potencial de fixação de nitrogênio. A variabilidade da relação de conversão  $\text{C}_2\text{H}_2$  tem sido da ordem de 1,6 a 3,4 (PETERS *et alii*, 1977; WATANABE *et alii*, 1977).

PETERS e CALVERT (1983), sugerem que para os cál

culos da atividade da nitrogenase, os fatores de conversão  $C_2H_2:N$  devem ser experimentalmente determinados. A relação teórica de 3  $C_2H_2$  reduzido:  $1N_2$  reduzido é frequentemente utilizada, porém, asseguram os autores, a relação real, em estudos "in vivo", é muito variável, dependendo de características de cada espécie e o relacionamento destas com o meio ambiente.

Em geral, as maiores críticas feitas à técnica da cromatografia gasosa para avaliação da fixação de nitrogênio residem no fato de ser este um método indireto (HARDY *et alii*, 1968; BREMMER, 1975; SAITO *et alii*, 1980), apesar de ser sensível e rápido.

No caso da *Azolla*, outro problema com a metodologia, nesse caso, é que, muitas técnicas utilizadas para incubar as plantas em acetileno sofrem por super-aquecimento na câmara de incubação, durante ensaios que exigem um período um pouco mais longo de exposição à atmosfera com acetileno (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982). O que torna mais grave a situação, é que como a atividade da nitrogenase é dependente da luz (PETERS *et alii* 1980a; BECKING, 1979), há a necessidade de fontes luminosas durante o período de incubação, o que aumentaria o calor no interior das câmaras. Para contornar este problema, o grupo do laboratório Kettering (USA) tem usado câmaras de incubação submersas em recipientes com água, com temperatura controlada, enquanto TALLEY e RAINS (1980) resfriam a câmara com uma serpentina de cobre submersa em gelo.

A principal desvantagem desse método é que ele

estima a atividade da enzima num período curto de tempo apenas e, extrapolações desses períodos pequenos para um completo ciclo envolvem riscos de se assumir algumas afirmações nem sempre válidas. A técnica da redução de acetileno não deve portanto ser recomendada para uma estimativa acurada da fixação de  $N_2$  pela *Azolla* em campo. Porém, em experimentos simples, onde buscam-se taxas relativas para se estimar fixação por exemplo entre diferentes estirpes de algas, essa técnica desempenha um papel bastante útil, prática e mais simples que a maioria dos métodos, podendo ser utilizada com segurança (FAO/IAEA, 1982).

#### 2.4.2. Uso do isótopo $^{15}N$

Quando os métodos existentes para avaliação da fixação biológica do nitrogênio são comparados, fica patente que, dentre todos, os mais precisos são aqueles que se utilizam de traçadores, no caso o  $^{15}N$ , para uma quantificação do fenômeno.

As maiores vantagens do uso do gás  $^{15}N$ , por exemplo, em leguminosas, devem-se à não necessidade do uso de plantas-controle, ao fato de ser possível isolar-se os efeitos dos fertilizantes e do solo sobre a fixação do  $N_2$ , e separar os efeitos de práticas agronomicas que podem afetar a produção, outros que não a fixação de nitrogênio (VOSE *et. alii*, 1981).



#### 2.4.2.1. Uso do $^{15}\text{N}_2$ gás

O método no qual se utiliza o  $^{15}\text{N}$  como gás, para quantificar-se a fixação do  $\text{N}_2$ , é a mais precisa das metodologias para esse tipo de análise. As plantas são confinadas em câmaras, geralmente de vidro, e a estas é aplicada uma atmosfera enriquecida com  $^{15}\text{N}_2$ . As desvantagens recairiam nos altos gastos, e também no fator tempo: no caso da *Azolla*, os experimentos devem ser de curta duração, para que as plantas permaneçam num sub-ambiente (portanto, sujeitas a stresses) o menor período possível.

Desta forma, resultados obtidos de estudos assim conduzidos tendem a ser instantâneos e sujeitos a erros, quando são extrapolados, de experimentos de curta duração, para todo um ciclo de crescimento, que normalmente envolve variações diurnas, diárias e sazonais. Devido a essas desvantagens, também esta metodologia não é recomendada para avaliação da fixação biológica do  $\text{N}_2$  pela *Azolla* em campo (FAO/IAEA, 1982).

Segundo LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), o uso do gás  $^{15}\text{N}_2$  poderia ser interessante na determinação de fatores de conversão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  fixado, e também em estimativas de potencial de fixação de  $\text{N}_2$  nas várias espécies de *Azolla*.

2.4.2.2. Uso do substrato enriquecido com  $^{15}\text{N}$ 

FRIED e BROESHART (1975) demonstraram que a relação  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  de fixadores de nitrogênio e controles não fixadores crescidos em substratos enriquecidos com  $^{15}\text{N}$  são diferentes. Esta diferença na composição isotópica é usada como uma medida de  $\text{N}_2$  fixado em vários sistemas fixadores de nitrogênio. A validade desses resultados depende fortemente da seleção de uma adequada planta não fixadora, denominada planta controle ou standard, a qual, supostamente, deve absorver nitrogênio do substrato na mesma proporção  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  que a fixadora em ausência de  $\text{N}_2$  fixado. No caso da *Azolla*, os possíveis controles podem ser: genótipos de *Azolla*, naturalmente livres de *Anabaena*; *Azolla* tratada com antibióticos para eliminar *Anabaena* ou outras espécies de plantas aquáticas (*Pistia*, *Lemna*).

A metodologia para marcação do substrato para estes organismos deve ser ainda investigada. Há muitas possibilidades de aplicação de diferentes materiais enriquecidos com  $^{15}\text{N}$  para estudos de fixação com *Azolla* (matéria orgânica enriquecida com  $^{15}\text{N}$ , uso de fertilizantes marcados, entre outros).

### 2.5. Uso da *Azolla*

Seu uso como adubo verde nos campos inundados de arroz do oriente remonta séculos. Já em 540 d.C. era descrito o uso da *Azolla* na cultura do arroz. Provavelmente foi a ocorrência espontânea de *Azolla* nos campos que contribuiu para seu reconhecimento, e consequente utilização como adubo verde. Perderam-se na história dados sobre o exato período do início de seu cultivo, mas, relatos de Dao e Tram (1979), citados por LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982) asseguram que este deu-se por volta do século II no Vietnã e, pelo menos na Dinastia Ming na China (1368-1644 d.C.).

Somente China e Vietnã têm tão longa tradição no cultivo desse adubo na cultura do arroz. É muito provável que, a cultura tenha sido descoberta numa época em que China e Vietnã, eram unidos, em alguma das províncias marítimas, espalhando-se depois por toda a costa este da Ásia (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

Um dos grandes desafios para a agricultura de todos os tempos sempre foi a manutenção da fertilidade dos solos, mesmo sendo estes submetidos a cultivos intensivos. A China tem sido vencedora nesse campo, com o uso de adubos verdes e fertilizantes orgânicos na agricultura, fazendo parte destes a *Azolla*.

Quando incorporada aos solos, *Azolla* melhora a qualidade e provoca aumentos nos níveis de húmus e nitrogê-

nio orgânico dos mesmos além de beneficiar suas características físicas e químicas. Devido ao alto teor de nitrogênio, e uma relação C/N favorável, a decomposição torna-se relativamente rápida. Após alguns anos de cultivo contínuo de *Azolla*, há um acúmulo de humus e nitrogênio que torna-se extremamente positivo. Auxilia também na retenção de umidade e na capacidade de troca catiônica dos solos (LUMPKIN e PLUCKNETT, 1982).

WATANABE *et alii* (1977), reportam que o nitrogênio da *Azolla* é lentamente liberado em solos inundados; 75% do N total é mineralizado num período de 6 a 8 semanas. Dados de SINGH (1979), informam que, em condições controladas, a 24°C, foram liberados 56% do N total da *Azolla* incorporada num período de três semanas enquanto que, nesse mesmo período, 80% do N total estava mineralizado quando a incubação foi a temperatura ambiente.

Experimentos em vasos realizados por WATANABE *et alii* (1981), revelaram que o nitrogênio proveniente da *Azolla* aumenta o crescimento do arroz mas, sua disponibilidade é 40% menor que a do N químico aplicado à cultura.

Há grande quantidade de dados na literatura que sugerem aumentos dramáticos na produção do arroz quando se introduz *Azolla* como adubo, porém, salienta GRIST (1979), este assunto deve ser tratado com reservas, devido à muitas vezes essas citações serem feitas sem o respaldo de experimentos bem conduzidos. Um exemplo disto é o relato de autoridades vietnamitas, que diz de aumentos de 50 a 100% na produção do arroz

em algumas regiões do país, após seu Ministério da Agricultura ter introduzido um extensivo programa para promover a utilização da associação simbiótica nas várzeas do país.

Aumentos de produção devido ao uso da *Azolla* de menos de 10 até mais de 100% já foram relatados por destacados pesquisadores de todo o mundo. Atenções devem ser voltadas no sentido de que, esses efeitos variam de acordo com vários fatores, como: espécie de *Azolla* usada, métodos de cultivo, época e método de incorporação.

Basicamente, os métodos de utilização da *Azolla* são:

1. Monocultura, sendo incorporada ao solo antes do plantio do arroz. A incorporação de duas ou três coberturas bem desenvolvidas de *Azolla* pode suprir o nitrogênio para a cultura de arroz, acarretando altas produções.
2. Consórcio. Pode haver competição entre as plantas, logo após o plantio do arroz, havendo inclusive, sintomas de deficiência. Porém, segundo CHU (1979), após os dez primeiros dias, começa a liberação de amônia pela *Azolla*, e os sintomas desaparecem.
3. Sistema combinado, há disponibilidade de nitrogênio desde o início do desenvolvimento da cultura do arroz.

SINGH (1977) obteve aumentos de 6% na produção quando *A. pinnata* foi crescida juntamente com o arroz e 9-38% quando foi incorporada ao solo. WATANABE *et alii* (1977) conseguiram 13% incorporando *A. pinnata* e, mais tarde, atingiu 35 - 45% de aumentos tem grãos, provavelmente devido à acumulação de N por incorporações sucessivas.

Já TALLEY e RAINS (1980), sugerem que, para as condições da Califórnia (USA) o meio mais efetivo de aumentar o incremento de N na cultura do arroz é o uso de um sistema integrado, combinando incorporação de *A. filiculoides* no solo antes do plantio do arroz, e um consórcio de *A. mexicana* e arroz durante o verão.

Experimentos que utilizavam luz x espécies de *Azolla* x liberação de nitrogênio mostraram ser *Azolla mexicana* mais eficiente que *A. filiculoides* na liberação de N (como amônia) diretamente no meio em que está se desenvolvendo.

Segundo CHU (1979), um dos fatores que influem sobre os efeitos benéficos da *Azolla* aplicada como adubo, é a variedade a ser utilizada. Na China muitas províncias aumentaram significativamente as áreas de cultivo da *Azolla* principalmente devido a programas de melhoramento genético que vêm sendo usados nas variedades. Por causa de novas variedades de *Azolla*, principalmente as tolerantes a extremos de temperatura *Azolla* hoje expande-se por uma área de 1400 ha, por todo o país.

Além de adubo verde para arroz, são relatados

outros numerosos usos para *Azolla*. Tem sido tradicionalmente utilizada na Ásia e parte da África, fresca, seca ou fermentada, como alimento para porcos, patos, galinhas e peixes. Como alimento, possui alto valor nutritivo, com um teor de 4% em nitrogênio e 35% de proteínas, em algumas espécies (RAINS e TALLEY, 1979). BUCKINGHAM *et alii* (1978), estudando a associação como alimentos para ratos, observaram que foi necessário um suplemento de apenas 3 aminoácidos essenciais.

MARGHERI *et alii* (1984) mostram a possibilidade de da cultura de *Azolla* usada no tratamento de águas poluídas principalmente com fosfatos e nitratos. SINGH (1979) sugere que, quando cozida, pode transformar-se em alimento para humanos, muito nutritivo.

Também menciona-se o uso da *Azolla* como composto para outras culturas irrigadas e como supressora de plantas daninhas.

### 2.5.1. Potencial de utilização da *Azolla* no Brasil

Os estudos sobre a associação simbiótica *Azolla-Anabaena* e seu uso como adubo verde no Brasil, têm um passado extremamente recente (por volta de 1977) especialmente se compararmos com o oriente, que possui tradição milenar na área (FIORE, 1985, comunicação pessoal).

Embora esta planta seja nativa de várias re-

giões brasileiras, sua ocorrência foi inicialmente citada somente em 1979, em Santa Catarina, e na Bacia Amazônica (SEHEM, 1979 e JUNK, 1979). As espécies de ocorrência natural no Brasil são três: *A. caroliniana*, *A. filiculoides* e *A. microphylla*, espalhadas e já coletadas em quase todos os estados brasileiros, (FIORE e GUTBROD, 1985).

Nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, *Azolla* ocorre naturalmente durante a estação das secas, e quando a média de temperatura situa-se por volta dos 22°C. No Sul e Sudeste, a planta é encontrada, principalmente durante o período em que as temperaturas elevam-se um pouco, porém, as chuvas não são ainda abundantes. Geralmente, seu aparecimento dá-se junto com outras plantas aquáticas como: *Lemna* spp; *Pistia* spp; *Salvinia* spp; *Eichornia* spp; *Oryza perene* e *Paspalum repens*, que a protege contra turbulência da água e radiações solares fortes (FIORE e GUTBROD, 1985). A Figura 4 mostra a distribuição da *Azolla* no Brasil.

Se bem manejados, as espécies nativas de *Azolla*, *A. caroliniana* e *A. microphylla* apresentam um crescimento satisfatório e liberam nitrogênio rapidamente ao arroz. A aplicação dessas espécies seria mais eficiente no sistema de consórcio.



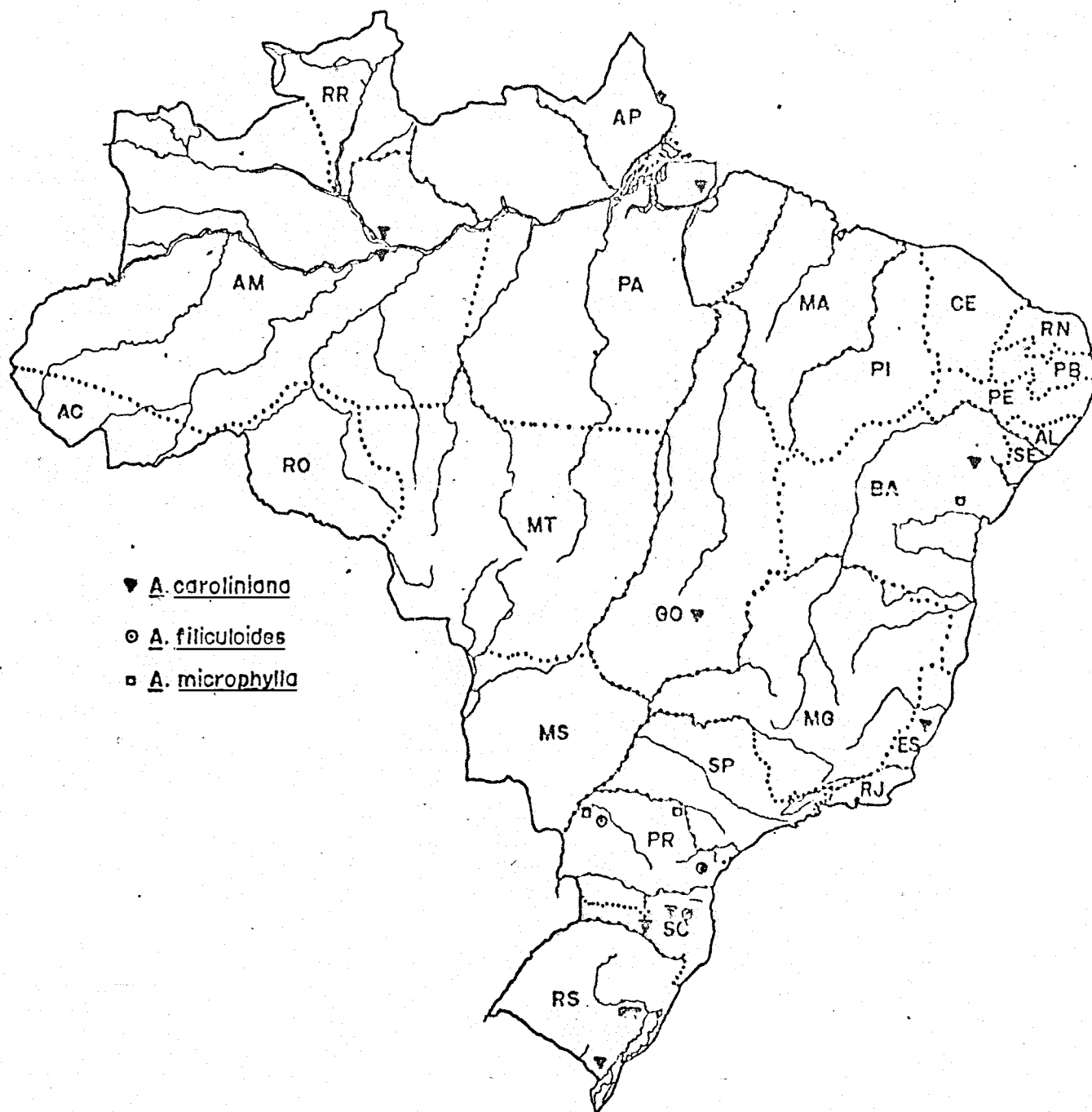


Figura 4 - Distribuição das espécies de *Azolla* no Brasil (FIORE e GUTBROAD, 1985).

FIORE (1984b), em experimento utilizando *Azolla filliculoides* sob diferentes sistemas de cultivo, no arroz, (em G0), observou que o consórcio *Azolla*-arroz apresentou um aumento de, aproximadamente, 15% na produção em relação à testemunha (sem N; sem aplicação de *Azolla* em qualquer forma). Os tratamentos de 60 kg/ha de nitrogênio mineral e 60 kg/ha de N mineral + *Azolla* mostraram aumentos de produção de 46 a 56% respectivamente, em comparação à testemunha. Os resultados não são significativamente diferentes entre si, porém, observar-se que só o consórcio com *Azolla* contribuiu para um acréscimo de 10% na produção, mesmo na presença de sulfato de amônio.

Ensaio de campo conduzidos em Santa Catarina, por NOLDIN e RAMOS (1983) cultivando *Azolla* sob três sistemas (antes do transplante, em consórcio e na entressafra do arroz), levaram a concluir que, os melhores resultados foram obtidos quando *Azolla* era cultivada e incorporada ao solo antes da semeadura do arroz. O cultivo em consórcio foi desconsiderado pois os autores não conseguiam que *Azolla* se desenvolvesse nessas condições talvez devido ao sombreamento proporcionado pelas plantas de arroz. No segundo ano do experimento, o tratamento com *Azolla*, incorporada produziu 20,1 e 8,9% acima da testemunha sem adubação e da testemunha com N-mineral, respectivamente, sugerindo um acúmulo de N no solo devido à utilização contínua da técnica de incorporação da *Azolla* ao solo.

Num cultivo de arroz em patamares de Terra Ro

xa, GUTBRØD (1984), encontrou que a incorporação de 70 kg N/ha de *Azolla filiculoides* antes da semeadura do arroz equivale à aplicação de mais de 50 kg N/ha. A consorciação do arroz com *Azolla caroliniana* produz efeito equivalente a cerca de 100 kg N/ha. Quando aplicação em pré-plantio e consorciação são combinados, os efeitos obtidos superam os conseguidos com 100 kg N/ha. Conclui o autor que parece ser possível a aplicação da *Azolla* em substituição ao adubo mineral.

Em experimentos conduzidos em Minas Gerais, Goiás e Paraná, o cultivo da *Azolla* na entressafra do arroz sem incorporação proporcionou rendimentos de respectivamente 5,20 e 100 kg N/ha equivalentes a fertilizante mineral à cultura. A combinação deste sistema com incorporação originou montantes maiores que 100 kg N/ha, equivalentes a fertilizante mineral, (FIORE e GUTBRØD, 1985).

Ainda segundo FIORE e GUTBRØD (1985), partindo-se de alguns ensaios preliminares, pode-se recomendar quatro práticas de manejo essenciais para as condições brasileiras:

1. Manutenção de uma lâmina d'água de 2-5 cm de profundidade, o que pode ser problemático para solos cujas taxas de infiltração excedem 20 mm/dia pois torna-se difícil a manutenção do nível da água.
2. Aplicações constantes de fertilizante fosfatado.

3. Correto manejo da densidade das plantas, durante a multiplicação o que implica na aplicação de um inóculo adequado e transferência deste para os campos em épocas e quantidades certas, para as condições tropicais e subtropicais.
4. Uso de *Azolla* livre de pragas, para atrasar a propagação dessas populações durante a multiplicação das plantas no campo.

As maiores limitações encontradas nas regiões brasileiras tradicionalmente produtoras de arroz, são, entre outras, aquelas devidas ao grande tamanho dos tabuleiros que são da ordem de 3 a mais de 20 ha e ao fato da água ser sucionada por bombas, provocando turbulência, impossibilitando assim o cultivo da *Azolla*. No Centro-Oeste, solos com alta capacidade de infiltração, aumentam a demanda por água e provocam a lixiviação de vários nutrientes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Fatores do Meio e a Simbiose *Azolla-Anabaena*

Numa primeira etapa, realizou-se uma série de ensaios em casa de vegetação, visando uma melhor compreensão, sobre o comportamento do sistema simbiótico *Azolla-Anabaena azollae* em relação ao meio-ambiente.

Os ensaios foram conduzidos utilizando-se vasos plásticos com capacidade para 300 ml. Foi utilizada a solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada, cuja composição encontra-se no Quadro 2. Os experimentos foram colhidos após 15 dias de inoculação das plantas de *Azolla*.

Quadro 2 - Composição da Solução modificada de HOAGLAND e ARNON (1950). Diluir 1:3.

$K_2SO_4$ (0,5 M)	5 ml/l
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (1,0 M)	2 ml/l
$CaHPO_4$ (0,1 M)	100 ml/l
$CaSO_4$ (0,01 M)	200 ml/l
FeEDTA**	1 ml/l
Solução de Micronutrientes**	1 ml/l

\*\* Composição da solução de micronutrientes.

$H_3BO_3$	2,86 g/l
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1,81 g/l
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,22 g/l
$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,02 g/l
$CuSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,08 g/l

\* FeEDTA: 33,2 g de NaEDTA em 89,2 ml de NaOH (1N). Adicionar 24,9 g  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  dissolvido em água. Deixar arejando por uma noite ao abrigo da luz. Completar 1 litro.

### 3.1.1. Metodologia para incubações "in situ", visando medidas da atividade da nitrogenase.

Um dos grandes problemas nos estudos relacionados com a simbiose *Azolla-Anabaena* é a escolha de uma correta metodologia para tornar possíveis as análises de redução de a

acetileno, através de cromatografia gasosa sem que se perturbe o ambiente no qual a *Azolla* vem se desenvolvendo.

#### - Sistema Intacto x Sistema Perturbado

O sistema tradicional (sistema perturbado), consiste em transportar-se uma determinada quantidade de *Azolla* dos vasos de crescimento para frascos de vidro, fechados, de volume conhecido, onde é feita a incubação com acetileno, a 10% do volume. Este método provoca uma perturbação no microambiente onde está se desenvolvendo a associação.

A metodologia aqui proposta (sistema intacto), tratou de incubar as plantas de *Azolla* nos próprios vasos onde estas vinham se desenvolvendo, da seguinte forma: os vasos foram vedados com camada dupla de plástico transparente. No interior dos recipientes injetou-se através de orifícios previamente feitos e vedados com borracha e silicone, acetileno a 10% do volume gasoso dos vasos. Após meia hora de incubação retirou-se 0,5 cc da atmosfera no interior dos vasos, que foram injetados em cromatografo de coluna de gás (PORAPAK-N 120 Mesch) determinando-se a quantidade de etileno formada (atividade da nitrogenase).

- Uso de propano para calibração interna

Para certificar-se de que não havia vazamentos no sistema proposto, testes foram feitos injetando-se nos vasos, juntamente com o acetileno a 10%, 500 ppm de propano.

Após a incubação por meia hora, amostras do gás foram analisadas por cromatografia gasosa, para verificar se a concentração de propano continuava inalterada.

3.1.2. Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH da solução.

Foram feitas observações do comportamento de seis espécies de *Azolla* (*microphylla*, *pinnata*, *nilotica*, *caroliniana*, *mexicana*, *filiculoides*) em 3 diferentes pHs da solução nutritiva (4,5; 5,5 e 6,5), utilizando-se 3 repetições para cada combinação espécie-pH. Controlou-se o pH diariamente, com NaOH e HCl, 0,1N.

As plantas foram incubadas com acetileno a 10% do volume por meia hora, de acordo com a metodologia descrita no ítem 3.1.1. e as amostras de gás foram analisadas. Determinou-se também a % de N e nitrogênio total das plantas (através do método de Kjeldahl) e peso da matéria seca (após as plantas terem sido secas a 60°C até peso constante).



### 3.1.3. Influência da luz e temperatura diurna na atividade da enzima nitrogenase.

Avaliou-se o comportamento da enzima nitrogenase, durante o período de 12 horas. Para tanto, *Azolla caroliniana* foi incubada por meia hora, com acetileno a 10% do volume gasoso, nos próprios vasos onde se desenvolveu, conforme ítem 3.1.1. Analisou-se amostras de gás sendo que sete medidas, com intervalos de duas horas foram feitas, a partir das 7:20 até às 19:20 horas, com três repetições. Durante todo o período, foram obtidos dados de radiação solar ( $\text{cal/cm}^2/\text{min}$ ) com o uso do aparelho EPPLEY e temperatura (utilizando-se termômetros comuns, graduação em Celsius).

### 3.1.4. Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de $\text{N}_2$ pela associação *Azolla-Anabaena*.

*Azolla-caroliniana* foi inoculada em vasos com solução nutritiva contendo diferentes fontes e doses de nitrogênio mineral, de acordo com o delineamento experimental a seguir:

Fonte: N	Doses (ppm)
Nitrato de amônio	50
	100
Sulfato de amônio	50
	100
Nitrato de potássio	50
	100
Uréia	50
	100
Testemunha	0

No 15º dia após a inoculação, todos os tratamentos foram coletados e os seguintes parâmetros foram analisados: atividade da enzima nitrogenase, de acordo com o item 3.1.1., e após a secagem das plantas por 48 horas em estufa, a 60°C, anotou-se peso da matéria seca e determinou-se, pelo método de Kjeldahl a % de N e nitrogênio total das plantas.

### 3.2. Marcação da *Azolla* com $^{15}\text{N}$ em solução

Procedeu-se à marcação da *Azolla caroliniana* utilizando-se como fonte de  $^{15}\text{N}$ , 100 ppm de N sob a forma de uréia a 4% átomos de  $^{15}\text{N}$ .

*Azolla* desenvolveu-se em bandejas plásticas (27,0 x 22,0 x 5 cm), com 3 litros de solução nutritiva de Hoagland (modificada). O inóculo inicial foi feito de forma a preencher metade da superfície das bandejas, para evitar desenvolvimento de algas verdes.

Por ocasião da colheita, (15 dias após inoculação), as plantas foram submetidas a lavagens com H<sub>2</sub>O destilada, visando eliminar principalmente algas verdes, aderidas às raízes. Foram feitas 3 lavagens em água corrente, após o que as plantas foram deixadas, em bandejas com H<sub>2</sub>O destilada por 24 horas.

Os parâmetros considerados foram: atividade de nitrogenase pelo método tradicional de incubação, pois as plantas foram crescidas em bandejas, havendo necessidade de transportá-las, no final do experimento, aos recipientes adequados; peso da matéria seca, após secagem por 48°C em estufa a 60°C; % N e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl e a % átomos de <sup>15</sup>N em excesso nas plantas, quando plantas sofreram preparo pelo método de DUMAS e foram analisadas em espectrômetro de massa VARIAN MT-19, da Seção de Ciências Ambientais do CENA.

### 3.3. Recuperação pelo arroz do N da *Azolla* incorporada ao solo

Após a marcação da *Azolla* com  $^{15}\text{N}$ , procedeu-se à incorporação do material ao solo, no qual foi plantado o arroz, sob irrigação por inundação, em vasos plásticos.

Dois métodos foram usados visando dados sobre a recuperação pelo arroz do N proveniente da *Azolla* incorporada. Os procedimentos experimentais foram idênticos em ambos os métodos.

Utilizou-se vasos plásticos com capacidade para 5 kg de solo Terra Roxa Estruturada, cujas características químicas se encontram no Quadro 3.

Quadro 3 - Resultados da análise química do solo utilizado para a incorporação da *Azolla*.

pH (água)	C %	P ppm	Meq/100 ml TFSA							
			K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Al <sup>+++</sup>	H <sup>+</sup>	CTC	S %	
5,2	1,1	3,0	0,32	2,7	0,9	0,1	3,0	7,0	3,9	55,7

A *Azolla*, após ter sido seca ao ar foi incorporada aos vasos na base de 0,10 g e 20 g de matéria fresca por vaso. Após a incorporação, os vasos foram mantidos úmidos na

capacidade de campo por três semanas, quando se procedeu à semeadura do arroz.

### 3.3.1. Método indireto usando solo marcado

*Azolla caroliniana*, crescida em solução nutritiva isenta de nitrogênio, foi incorporada ao solo TRE que já apresentava-se marcado com nitrogênio-15 e devidamente, estabilizado (0,7% át.  $^{15}\text{N}$ ). A *Azolla* foi aplicada com base em 0,10 e 20 g de matéria fresca. No Quadro 4 pode-se verificar o delineamento utilizado para esse método, bem como as características do material incorporado.

Quadro 4 - Delineamento experimental usado para o método indireto de avaliação da recuperação do N da *Azolla* com uso de solo marcado (0,7% át.  $^{15}\text{N}$ ).

Dose <i>Azolla</i> (g mat. fresca/vaso)	Peso m.s. incorporada(mg)	% N <i>Azolla</i>	N-total (mg) <i>Azolla</i>	N- <i>Azolla</i> incorp. ao solo (mg/kg solo)
0	-	-	-	-
10	1.000	4,22	42,22	8,44
20	2.000	4,22	84,44	16,88

3.3.2. Método direto usando *Azolla* marcada.

*Azolla caroliniana*, após ter sido devidamente marcada com  $^{15}\text{N}$  através de solução nutritiva acrescida de  $^{15}\text{N}$  (100 ppm de nitrogênio na forma de uréia a 4% átomos de  $^{15}\text{N}$  foi incorporada ao solo TRE também em 3 doses (0, 10 e 20 g de matéria fresca de *Azolla*). O Quadro 5 mostra o delineamento do experimento e as características da *Azolla* incorporada.

Quadro 5 - Delineamento experimental do método direto de avaliação da recuperação do N da *Azolla* com uso de *Azolla* marcada.

Doses (g/mat. fresca/vaso)	Peso mat. seca incorporada (mg/vaso)	%N	N-total (mg)	N- <i>Azolla</i> inc. ao solo (mg/kg solo)	%át. $^{15}\text{N}$
0	-	-	-	-	-
10	1000	4,92	49,2	9,85	2,81
20	2000	4,92	98,4	19,70	2,81

### 3.3.3. Tratos culturais e coleta e análises das plantas de arroz

Após a incorporação da *Azolla* ao solo, sementes de arroz variedade IAC 1278 foram plantadas nos vasos. O solo recebeu uma adubação básica de P (86 ppm) e 1 ml/kg de solo da seguinte solução de micronutrientes:  $H_3BO_3$  (2,86 g/l);  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (1,81 g/l);  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,22 g/l);  $H_2MoO_4 \cdot 4H_2O$  (0,02 g/l);  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,08 g/l).

No 14º dia após o plantio foi feito o desbaste das plantas, deixando-se 5 plantas por vaso. Ao atingirem 15 cm de altura forneceu-se uma lâmina de água de 4 cm de altura.

Foram feitas duas pulverizações com Azodrin e Dithane, para o controle preventivo de insetos e brusone, no 21º dia após o plantio.

A coleta das plantas foi feita 63 dias após o plantio. Não houve emissão de panícula, uma vez que as condições ambientais foram desfavoráveis (inverno rigoroso).

As plantas foram cortadas na altura do solo e a parte aérea e raízes foram secas em estufa a 60°C até peso constante.

Os parâmetros analisados foram: peso da matéria fresca e seca, porcentagem de nitrogênio e nitrogênio total (método de Kjeldahl) e % de átomos em excesso de  $^{15}N$  pelo método de Dumas em espectrômetro de massa ATLAS-VARIAN-MAT mo

delo CH-4. .

### 3.4. Determinação do N derivado do Solo e da *Azolla* incorporada

#### 3.4.1. Método direto

O nitrogênio proveniente da *Azolla* (%NPA) através do método direto foi calculado a partir do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas plantas de acordo com TRIVELIN *et alii* (1973):

$$\%NPA = \frac{\% \text{ átomos excesso } ^{15}\text{N} \text{ na parte aérea do arroz}}{\% \text{ átomos excesso } ^{15}\text{N} \text{ na } Azolla \text{ incorporada}} \times 100$$

O nitrogênio proveniente do solo (NPS) foi calculado por diferença, uma vez que as únicas fontes de nitrogênio disponíveis eram o do solo e o proveniente da decomposição da *Azolla*. Portanto:

$$\%NPS = 100 - \%NPA$$

Com esses dados calculou-se as quantidades de nitrogênio proveniente dessas fontes da seguinte forma:



$$QNPA = \frac{\%NPA \times N \text{ total arroz}}{100} = (\text{mg N nas plantas})$$

$$QNPS = N \text{ total} - QNPA$$

### 3.4.2. Método indireto

Pelo método indireto determinou-se o nitrogênio proveniente do solo (NPS) e por diferença foi calculado o N proveniente da *Azolla*:

$$\%NPS = \frac{\% \text{ átomos excesso } ^{15}\text{N na parte aérea do arroz}}{\% \text{ átomos excesso } ^{15}\text{N na fração mineral de N do solo}} \times 100$$

O cálculo da % átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso na fração mineral de N do solo foi efetuado a partir do uso de plantas controle desenvolvidas em solo sem incorporação.

Cálculo do N proveniente da *Azolla*:

$$\%NPA = 100 - \%NPS$$

De modo semelhante ao item 3.4.1., calculou-se as quantidades de N proveniente de ambas as fontes.

### 3.5. Recuperação do $^{15}\text{N}$ incorporado ao solo na forma de *Azolla*

A recuperação do  $^{15}\text{N}$  da *Azolla* pelas plantas

de arroz foi assim obtida:

$$\%R = \frac{\%NPDA \times N \text{ total}}{\text{quantidade total de N incorporado como Azolla}}$$

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Fatores do meio-ambiente e a simbiose *Azolla-Anabaena*

#### 4.1.1. Determinação da atividade da nitrogenase (redução de $C_2H_2$ "in situ")

Buscou-se com esse experimento uma padronização da metodologia de medida da atividade da enzima nitrogenase no sistema fixador *Azolla-Anabaena*, sem que se causasse perturbações no ambiente normal de desenvolvimento das plantas.

A Tabela 1 apresenta dados comparativos dos valores obtidos em *Azolla caroliniana* quando se mede a atividade da enzima nitrogenase no próprio vaso de crescimento ("sistema intacto") e quando a medida é feita, após transferência do conteúdo do vaso ao frasco de incubação ("sistema perturbado"), método comumente usado na pesquisa. A atividade da nitrogenase quando medida

Tabela 1 - Determinação da atividade da nitrogenase (redução de  $C_2H_2$  "in situ" em *Azolla caroliniana* em vasos plásticos mantidos em casa-de-vegetação, após 15 dias de desenvolvimento. Médias de 3 repetições.

Sistema	Atividade nitrogenase ( $\eta$ mol $C_2H_4/g.h$ )	Peso matéria seca (mg/vaso)
Intacto	1266,0 $\pm$ 95	563 $\pm$ 95
Perturbado	717,5 $\pm$ 45	546 $\pm$ 25

pelo método onde ocorre perturbação do sistema, mostrou uma redução numérica da ordem de 40%, em relação ao método onde se avalia o "sistema intacto". Essa redução pode ser devida à per-turbação do ambiente, influenciando sobre a atividade da nitro-genase, uma vez que os outros fatores eram idênticos, para os dois métodos.

Usando propano como controle interno do siste-ma intacto, constatou-se que ocorreram vazamentos; sendo estes da ordem de 4% do volume do vaso fechado, para 30 minutos de incubação das plantas. Considerou-se a metodologia como efi-ciente, simples e com bom índice de precisão, sendo adotada para uso nos experimentos posteriores.

#### 4.1.2. Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH do meio

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram os parâmetros analisados no presente experimento (produção de biomassa, atividade da enzima nitrogenase, N-total e a % de N, respectivamente das plantas de *Azolla*).

Durante o período do experimento (15 dias) as plantas de *Azolla* não acusaram diferenças visuais no desenvolvimento, entre os diferentes pHs. O crescimento foi normal, sendo que o número de plantas nos vasos era dobrado a cada período de 4-5 dias. A coloração das plantas não mostrou alteração, mantendo-se dentro dos padrões normais para cada espécie de *Azolla*.

Esses fatos são concordantes com aqueles encontrados na literatura, que dizem que a associação pode sobreviver em ampla faixa de pH: 3,5 a 10,0, segundo NICKEL (1961), ASHTON (1974); WATANABE *et alii* (1977) e PETERS *et alii* (1980a). Como os pHs aqui utilizados foram 4,5; 5,5 e 6,5, podem ser considerados dentro da faixa na qual o desenvolvimento da associação continua normal.

Entre as espécies, as que apresentaram maior influência dos diferentes pHs, com menor acúmulo de matéria seca (Tabela 2) foram a *Azolla pinnata* e a *A. nilotica*. O valor de pH 5,5 foi nesse parâmetro o que mais beneficiou as espécies de *Azolla*. *A. microphylla*, foi a espécie menos sensível

aos diferentes pHs, mostrando maiores acúmulos de matéria seca nos pHs 4,5 e 5,5 (0,57 e 0,61 g matéria seca/vaso, respectivamente sendo ligeiramente prejudicada quando este se elevou a 6,5 (0,52 g/vaso).

Para todas as espécies estudadas, a maior taxa de crescimento (em termos de ganho de matéria seca/dia) foi encontrada no pH 5,5 e a menor, no pH 4,5. WATANABE *et alii* (1977), assumiram, em estudos em casa-de-vegetação, que o pH da solução nutritiva no qual houve melhor adaptação da associação *Azolla-Anabaena* foi 5,5, confirmando os nossos resultados.

Observando-se os dados de atividade da nitrogenase ( $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g.h}$ ), na Tabela 3, nota-se que não houve significativas diferenças para esse parâmetro na interação pH versus espécies de *Azolla*, encontrando-se apenas um efeito isolado entre as espécies dentro dos pHs 4,5 e 5,5.

WATANABE *et alii* (1977) observaram que, somente acima de um valor 7,5 de pH houve alguma inibição da atividade da nitrogenase, enquanto que TALLEY *et alii* (1977) constataram que acima de pH 8,5 há a necessidade de uma fonte suplementar de ferro para o desenvolvimento normal da associação.

Estudos anteriormente realizados em casa-de-vegetação do CENA, usando 3 níveis de pH em solução nutritiva, para *Azolla filiculoides*, evidenciaram que o pH 5,5 favoreceu a atividade da nitrogenase (FIORE e RUSCHEL, 1981).

A porcentagem de nitrogênio da matéria seca das plantas (Tabela 4) variou de 3,92 a 7,14% para as seis espécies dentro dos 3

pHs, dados que vão de encontro aqueles citados na literatura. (3-6% de nitrogênio encontrados por autores como MOORE, 1969; TALLEY e RAINS, 1980; TALLEY *et alii*, 1977; WATANABE *et alii*, 1977). De acordo com LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), quando se obtêm porcentagens de nitrogênio nas plantas de *Azolla* entre 3,5 a 4,0%, há indicações de que, tanto a disponibilidade de P na solução quanto a temperatura ambiente, os fatores que mais influenciam o desenvolvimento da *Azolla*, não estariam atuando como limitantes. De fato, o experimento foi conduzido em época de temperaturas favoráveis ao desenvolvimento da associação (diurnas na faixa de 25-35°C e noturnas entre 18 e 25°C).

A Tabela 5 mostra os acúmulos de nitrogênio nas plantas. Também aqui, o pH mais favorável às espécies foi o de valor 5,5. Em média, a espécie que apresentou maiores %N e acúmulo de nitrogênio na matéria seca foi a *Azolla filiculoides* (6,02% e 0,031mg N/vaso). As menores taxas para nitrogênio encontraram-se na *A. nilotica* (4,39% N e 0,018mg N/vaso) que também apresentou menores taxas de acúmulo de matéria seca. O teor de nitrogênio, portanto, esteve diretamente ligado ao crescimento.

*Azolla microphylla* destacou-se como espécie tolerante a baixo pH (valores 4,5 e 5,5), apresentando taxas de crescimento e acúmulo de matéria seca em geral acima das médias das outras espécies.

Tabela 2 - Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH do meio -  
 Produção de biomassa (g matéria seca/vaso) após desenvolvimento  
 de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Espécies	pH			$\bar{x}$
	4,5	5,5	6,5	
<i>A. caroliniana</i>	0,55 a	0,55 ab	0,47 b	0,52 a
<i>A. filiculoides</i>	0,53 b	0,53 ab	0,49 ab	0,51 a
<i>A. mexicana</i>	0,52 abc	0,54 ab	0,58 a	0,55 a
<i>A. microphylla</i>	0,57 a	0,61 a	0,52 ab	0,56 a
<i>A. nilotica</i>	0,43 c	0,38 c	0,44 b	0,42 b
<i>A. pinnata</i>	0,45 bc	0,46 bc	0,45 b	0,45 b
$\bar{x}$	0,57 ab	0,61 a	0,52 b	

C.V. = 7,6%

Tukey 5%

dms (spp.) = 0,05

dms (pH) = 0,07



Tabela 3 - Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH do meio - Atividade da nitrogenase ( $\eta\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g.h}$ ), após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Espécies	pH			$\bar{x}$
	4,5	5,5	6,5	
<i>A. caroliniana</i>	236,9 ab	249,7 ab	261,2	249,3
<i>A. filiculoides</i>	289,5 ab	329,8 a	348,6	322,6
<i>A. mexicana</i>	222,5 a	305,8 a	287,7	272,0
<i>A. microphylla</i>	358,1 ab	64,8 b	417,1	280,0
<i>A. nilotica</i>	273,1 ab	298,2 a	309,1	293,5
<i>A. pinnata</i>	464,5 a	316,5 a	192,5	324,5
$\bar{x}$	307,4	260,8	302,7	

C.V. = 32,6%

Tukey 5%

dms para interação spp. dentro pH = 232,9

dms para interação pH dentro spp. = 189,26

Tabela 4 - Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH do meio -  
Concentração de N (%) na biomassa obtida após 15 dias de desen-  
volvimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Espécies	pH			$\bar{x}$
	4,5	5,5	6,5	
<i>A. caroliniana</i>	5,04	5,43	4,33	4,93 ab
<i>A. filiculoides</i>	5,08	5,85	7,14	6,02 a
<i>A. mexicana</i>	4,43	5,85	5,01	5,09 ab
<i>A. microphylla</i>	4,76	5,77	4,72	5,08 ab
<i>A. nilotica</i>	4,51	4,76	3,92	4,39 b
<i>A. pinnata</i>	4,66	5,35	5,40	5,13 ab
$\bar{x}$	4,74	5,50	5,08	

C.V. = 18,1%

Tukey 5%

dms (spp.) = 1,31

dms (pH) = n.s.

dms (spp. x pH) = n.s.

Tabela 5 - Comportamento de espécies de *Azolla* em relação ao pH do meio - N total (mg/vaso) na biomassa, obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Espécies	pH			$\bar{x}$
	4,5	5,5	6,5	
<i>A. caroliniana</i>	0,030	0,030	0,020	0,026 ab
<i>A. filiculoides</i>	0,026	0,033	0,033	0,031 a
<i>A. mexicana</i>	0,023	0,033	0,026	0,027 ab
<i>A. microphylla</i>	0,030	0,033	0,024	0,029 ab
<i>A. nilotica</i>	0,020	0,020	0,016	0,018 c
<i>A. pinnata</i>	0,020	0,023	0,026	0,023 bc
$\bar{x}$	0,025 ab	0,028 a	0,024 b	

C.V. = 19,9%

Tukey 5%

dms (spp.) = 0,007

dms (pH) = 0,004

dms (pH x spp.) = n.s.

#### 4.1.3. Influência da luz e temperatura diurna na atividade da enzima nitrogenase

O presente experimento visou informações sobre o comportamento da atividade da enzima nitrogenase durante o transcorrer de 12 horas do período luminoso.

O pico da atividade da nitrogenase foi observado às 11 horas, quando atingiu valores próximos a 900  $\eta\text{mol}$  de etileno produzido/g.h. A alta observada nesse horário indica que, a atividade da nitrogenase teve influência principalmente da luz, conforme pode ser observado na Figura 5, onde nota-se que os picos da intensidade luminosa ( $\text{cal}/\text{cm}^2.\text{h}$ ) e da atividade da nitrogenase são coincidentes.

A temperatura mostra-se ser um fator decorrente à radiação solar, uma vez que a máxima ocorre posteriormente ao pico de máxima variação.

Quando se compararam resultados de vários autores, sobre valores da atividade da enzima nitrogenase, pode-se observar que ainda há a necessidade de padronização de metodologia para medidas da atividade da nitrogenase na *Azolla* (PETERS e ITO (1984)). Um estudo do comportamento da enzima frente às variações da intensidade luminosa e temperatura diurna viria auxiliar nesse campo.

Resultados obtidos com gás acetileno, e mesmo  $^{15}\text{N}_2$ , tendem a ser válidos somente instantaneamente, dando margem a erros, quando extrapolados para todo um ciclo de cresci-

mento, que envolve variações durante os períodos diurnos/noturnos e mesmo durante a estação de crescimento (FAO/IAEA, 1982).

Baseando-se nos fatos apresentados pela literatura e nos resultados obtidos por este experimento, padronizou-se efetuar-se as medidas da atividade da nitrogenase, dentro da faixa de máxima obtida (entre 10:00 e 11:00 horas) para utilização nos ensaios subseqüentes.

Deve-se ter em conta, entretanto, que nas condições naturais a *Azolla* está submetida a variações cotidianas de intensidade luminosa muito maiores que aquelas dadas em condições controladas, sendo os resultados obtidos em casa-de-vegetação dificilmente extrapolados para as condições de campo (VAN HOVE e LOPEZ, 1983).

#### 4.1.4. Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de $N_2$ pela *Azolla*

Neste ensaio, as plantas desenvolvidas em solução nutritiva acrescida de nitrogênio mostraram um aspecto quebradiço e um tamanho menor que aquelas desenvolvidas na solução sem fonte de N. Esse desenvolvimento anormal deve-se, provavelmente, ao efeito inibitório do N exógeno à fixação biológica do nitrogênio, que é a fonte preferencial de N para a *Azolla*, conforme citado na literatura (PETERS *et alii*, 1977; PETERS *et alii*, 1980a).

A Tabela 6 apresenta os resultados de atividade da enzima nitrogenase na *Azolla caroliniana* frente as 4 fontes e 3 doses de N na solução. A atividade da enzima diminuiu em 67% e 75%, em relação ao tratamento sem nitrogênio, para respectivos acréscimos de 50 e 100 ppm de nitrogênio mineral na solução.

Nitrato de amônio parece ser a fonte de nitrogênio mineral que menos influenciou a atividade da nitrogenase, diminuindo-a em cerca de 40%. As fontes mais inibidoras foram nitrato de potássio e sulfato de amônio, seguidas pela uréia.

PETERS e MAYNE (1974b), encontraram que nitrato e uréia inibiram a atividade da enzima em até 30%. No presente experimento encontrou-se, quando se usou nitrato de potássio uma redução de 50% da atividade, e aproximadamente 35% quando da utilização da uréia.

O efeito das doses crescentes dentro de cada tratamento também foi observado. Quando dobraram-se as doses (de 50 para 100 ppm) de sulfato de amônio e nitrato de potássio, observaram-se depreciações de até 75% na atividade da nitrogenase, o mesmo não acontecendo com os aumentos das doses de nitrato de amônio e uréia.

Deve-se salientar, porém, que os valores deste experimento, foram obtidos num espaço de tempo de 15 dias de desenvolvimento das plantas na presença de fontes de nitrogênio combinado. Segundo WATANABE *et alii* (1981), esses resultados podem variar, de acordo com a extensão desse período e que,

inclusive, a atividade da nitrogenase pode ser 100% recuperada se as plantas desenvolvidas em meio contendo nitrogênio mineral forem removidas para outro, isento do elemento.

PETERS *et alii* (1981) afirmam que apesar do N-combinado ter depreciado a atividade da nitrogenase, este não afetou significativamente o crescimento da biomassa.

No presente experimento, o acréscimo de 50 ppm de nitrogênio causou significativa diminuição de produção de matéria seca (40%, em média). Quando elevou-se o teor de nitrogênio na solução a 100 ppm, deprimiu-se em até 50% a produção de biomassa, não havendo efeitos de fontes diferentes de N (Tabela 7).

Pela Tabela 8 observa-se que não houve efeitos significativos das fontes e doses de nitrogênio combinado sobre a % de N nas plantas, variando de 3,80 a 5,09 dependendo da fonte e dose.

Quanto ao N-total das plantas, a Tabela 9 mostra que diferenças significativas não foram observadas entre os tratamentos 0 e 50 ppm de N, porém, essas são notadas quando são adicionados 100 ppm de N, sob qualquer forma. Quando se adicionou 50 ppm na forma de sulfato de amônio, a quantidade de nitrogênio acumulada foi maior que no controle sem N, apesar da primeira ter ocasionado decréscimos, tanto na atividade da nitrogenase quanto na produção de biomassa das plantas (Tabela 7).

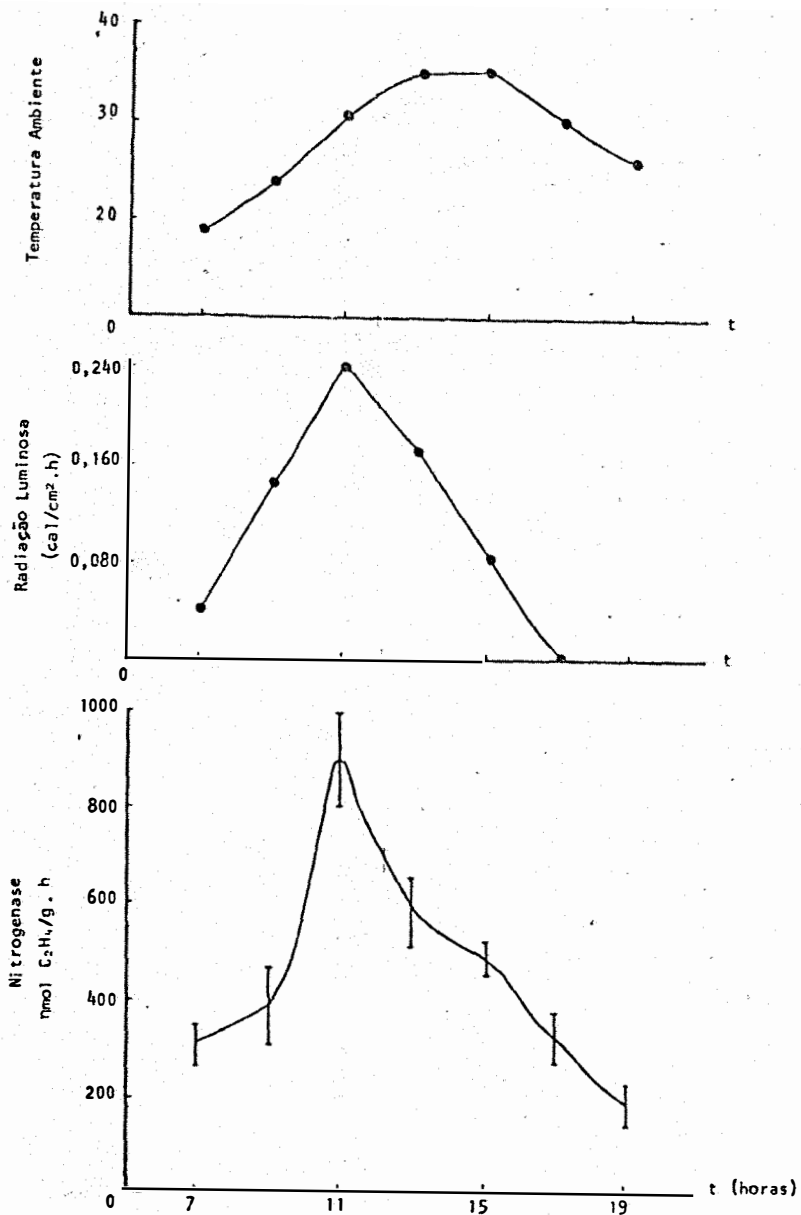


Figura 5 - Influência da luz e temperatura diurna na atividade da nitrogenase em *Azolla*.



Tabela 6 - Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de  $N_2$  pela *Azolla* - Atividade da nitrogenase ( $\eta$ moles  $C_2H_4/g.h$ ), após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Fontes	Doses (ppm)			$\bar{x}$
	0	50	100	
Nitrato de amônia	1265,7 A	471,8 B	471,3 aB	736,3 a
Sulfato de amônia	1265,7 A	335,0 B	197,6 bB	599,4 b
Nitrato de potássio	1265,7 A	428,1 B	109,6 bC	601,1 b
Uréia	1265,7 A	394,3 B	463,8 aB	707,9 ab
$\bar{x}$	1265,7 a	407,3 b	310,6 b	

C.V. = 14,9 %

dms (fonte) = 128,29

dms (doses) = 100,56

dms (fontes x doses) = 201,13

Tukey 5%

. letras minúsculas (a,b,c) = interação entre linhas

. letras maiúsculas (A,B,C) = interação entre colunas

Tabela 7 - Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de  $N_2$  pela *Azolla* - Produção biomassa (g matéria seca/vaso) após desenvolvimento de 15 dias em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Fontes	Doses (ppm)			$\bar{x}$
	0	50	100	
Nitrato de amônio	0,56	0,50	0,25	0,44
Sulfato de amônio	0,56	0,29	0,18	0,34
Nitrato de potássio	0,56	0,30	0,32	0,40
Uréia	0,56	0,45	0,33	0,45
$\bar{x}$	0,56 a	0,39 b	0,27 c	

C.V. = 20,4%

dms (fonte) = n.s.

dms (dose) = 0,085

dms (fonte x dose) = n.s.

Tukey 5%

Tabela 8 - Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de  $N_2$  pela *Azolla* - Concentração de N(%) na biomassa obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Fontes	Doses (ppm)			$\bar{x}$
	0	50	100	
Nitrato de amônio	4,73	4,03	4,30	4,35
Sulfato de amônio	4,73	4,03	4,12	4,30
Nitrato de potássio	4,73	3,80	4,04	4,19
Uréia	4,73	4,63	5,09	4,82
$\bar{x}$	4,73	4,12	4,39	

C.V. = 14,16%

dms (fontes) = n.s.

dms (doses) = n.s.

dms (fontes x doses) = n.s.

Tukey 5%

Tabela 9 - Influência de fontes e doses de nitrogênio no desenvolvimento e na fixação de  $N_2$  pela *Azolla* - N-total (mg/vaso) na biomassa obtida após 15 dias de desenvolvimento em casa-de-vegetação. Médias de três repetições.

Fontes	Doses (ppm)			$\bar{x}$
	0	50	100	
Nitrato de amônio	0,027	0,020 B	0,0103	0,019
Sulfato de amônio	0,027 a	0,045 aA	0,0073 b	0,026
Nitrato de potássio	0,027	0,113 B	0,0130	0,017
Uréia	0,027	0,016 B	0,0170	0,020
$\bar{x}$	0,027 a	0,023 a	0,012 b	

C.V. = 45,76%

dms (fontes) = n.s.

dms (doses) = 0,01

dms (fontes x doses) = 0,019

Tukey 5%

. letras minúsculas (a,b,c) = interação entre linhas

. letras maiúsculas (A,B,C) = interação entre colunas

#### 4.2. Marcação da *Azolla* com $^{15}\text{N}$ em solução

*Azolla caroliniana* desenvolveu-se em bandejas, com solução nutritiva acrescida de uréia, a 100 ppm de N, 4%  $\hat{a}$  tomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso. O inóculo inicial foi de 2,5 g, baseado na recomendação de uso de 50 g *Azolla* (matéria fresca)/m<sup>2</sup>.

Observou-se que a atividade da nitrogenase das plantas crescidas em solução acrescida de uréia foi 55% menor em relação  $\hat{a}$  aquelas cujo desenvolvimento ocorria em solução nutritiva isenta de N. Convém lembrar porém, que no presente ensaio mediu-se a atividade da nitrogenase pelo método tradicional, com perturbação do ambiente, enquanto que nos outros experimentos esta atividade foi medida utilizando-se a metodologia proposta no item 3.1.1. (sem perturbação do ambiente no qual a planta vem desenvolvendo-se).

Através do método da diferença, com uso de  $^{15}\text{N}$ , foi calculada a % de nitrogênio na *Azolla* proveniente da fixação. Encontrou-se, após 15 dias de desenvolvimento das plantas em solução com  $^{15}\text{N}$ , que 28,66% do nitrogênio da planta era proveniente da fixação (Tabela 10).

O valor aqui encontrado vai de encontro aos resultados de WATANABE (1983), que usou  $^{15}\text{N}$ , em solução (1,48 g N/m<sup>2</sup> do tanque) e uma planta não fixadora (*Lemna minor* L.), constatando após 15 dias de crescimento em solução marcada, taxa de fixação de N<sub>2</sub> de 35%. Porém, após 28 dias da inoculação, essa taxa havia elevado-se a 86%.

Tabela 10 - Marcação da *Azolla caroliniana* com  $^{15}\text{N}$  em solução de uréia a 4% átomos de  $^{15}\text{N}$  durante 15 dias de crescimento. Médias de três leituras.

Dose N	%N	N-total (g/bandeja)	% át. $^{15}\text{N}$ planta	% recup. pela <i>Azolla</i> $^{15}\text{N}$ da so- lução	N-fixa- ção (%)	Atividade $\text{N}_2$ ase ( $\mu\text{moles}$ $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g.h}$ )
100 ppm	4,92	0,318	2,81	71,34	28,66	51,5
0	4,22	0,273	-	-	-	126,6

FIGURE *et alii* (1979), concluíram que após 10 dias de desenvolvimento em solução com nitrato de potássio (50 ppm de N, como  $\text{KNO}_3$ ) marcado com  $^{15}\text{N}$ , a porcentagem de nitrogênio derivado da fixação era de 64 a 69%, enquanto que o derivado da solução estava na faixa dos 31 a 36%.

Em outros trabalhos, WATANABE *et alii* (1981) concluíram que o nitrogênio derivado da fixação na *Azolla*, correspondia a 30% do total, quando em presença de N mineral.

No final do experimento, obteve-se em média 64,7g de matéria fresca/bandeja, de *Azolla caroliniana*, marcada a 2,81% átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso, para o estudo posterior de incorporação da *Azolla* em arroz inundado, em casa-de-vegetação.

#### 4.3. Recuperação, pelo arroz, do $^{15}\text{N}$ da *Azolla* incorporada ao solo

As plantas de arroz foram coletadas (conforme descrito em 3.3.) e analisadas. Os resultados dos parâmetros observados constam nas Tabelas 11, 12, 13 e 14.

Para a obtenção das taxas de recuperação, pelo arroz, do nitrogênio proveniente da mineralização da *Azolla caroliniana* incorporada ao solo, dois métodos de marcação foram utilizados: o método indireto, que se utilizou de um solo TRE marcado a 0,7% át.  $^{15}\text{N}$  ao qual foi incorporada *Azolla*, matéria fresca não marcada, e o método direto, onde *Azolla* marcada, a

2,81%át.  $^{15}\text{N}$  foi incorporada a solo TRE que continha apenas a abundância natural de átomos de  $^{15}\text{N}$  (0,366% át.  $^{15}\text{N}$ ).

Plantas de arroz desenvolvidas em solo sem incorporação de *Azolla* foram utilizadas como controle. Os cálculos foram feitos baseados na abundância do elemento  $^{15}\text{N}$  nessas plantas.

As porcentagens de recuperação de nitrogênio obtidas pelos dois métodos foram semelhantes (Tabelas 11 e 12). Para a dose de 10 g de *Azolla caroliniana* (matéria fresca incorporada), obteve-se, pelo método direto, que 13,14% do nitrogênio total absorvido pelas plantas de arroz, era proveniente da *Azolla* e, pelo método indireto, a taxa obtida foi de 13,26%.

Para doses de 20 g de matéria fresca de *Azolla*, obteve-se pelo método direto que a recuperação foi de 11,05%, enquanto que pelo indireto as taxas foram, em média, de 7,27%.

Embora os resultados tenham sido semelhantes, deve-se levar em consideração a variabilidade encontrada dentro dos dois métodos. O método direto mostrou-se bastante superior ao método indireto quanto à precisão das medidas obtidas pois, enquanto o primeiro apresentou uma porcentagem de erro de 10,33%, entre as repetições, o segundo apresentou 48,24% de variação, mostrando um grau de confiabilidade menor.

Os valores de porcentagem de nitrogênio na planta proveniente da *Azolla* (%NPA) quantidade de nitrogênio derivado da planta (QNPA, em mg/vaso) e % de recuperação do nitrogênio, obtidos através do método direto, mostram que houve



uma proporcionalidade entre a dose de N aplicada (na forma de *Azolla*), e a dose de N recuperada pelo arroz.

O método indireto mostrou valores próximos aos do direto, apenas nos dados das plantas de arroz desenvolvidas sob a dose mais baixa de *Azolla* incorporada, não estampando proporcionalidade.

Partindo-se do princípio da diluição isotópica que preconiza que a planta não discrimina  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  do solo, absorvendo-os em proporções semelhantes às aquelas fornecidas pelo meio, pode-se supor que através do método indireto, houve uma diluição muito grande do nitrogênio da *Azolla* dentro do reservatório de  $^{15}\text{N}$  do solo.

Pelas Tabelas 13 e 14, observa-se que o desenvolvimento do arroz, pelos dados obtidos através dos dois métodos, foi equivalente, não havendo resposta diferencial das plantas à aplicação de diferentes doses de *Azolla caroliniana* ao solo.

Tabela 11 - Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Plantas colhidas aos 63 dias após plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Determinações obtidas através de método indireto, onde se utilizou solo marcado (0,70% át.  $^{15}\text{N}$ ) e *Azolla caroliniana* não marcada.

Dose <i>Azolla</i> g matéria fresca/ vaso)	% Át. $^{15}\text{N}$	%NPA	QNPA (mg/vaso)	% Recupera- ção N prove- niente <i>Azolla</i>
10	0,639	1,80	2,52	5,82
	0,631	4,68	7,02	16,65
	0,618	9,35	8,41	20,18
	0,634	3,60	2,61	10,40
	$\bar{M}=0,630$	$\bar{M}=4,86$	$\bar{M}=5,03$	$\bar{M}=13,26$
	( $\pm 0,0078$ )	( $\pm 2,790$ )	( $\pm 2,735$ )	( $\pm 6,4$ )
	% de erro do método = 48,24			
20	0,639	1,80	2,34	2,38
	0,624	7,19	7,91	11,07
	0,633	3,96	3,56	5,20
	0,624	7,19	8,63	10,45
	$\bar{M}=0,630$	$\bar{M}=5,04$	$\bar{M}=5,61$	$\bar{M}=7,27$
	( $\pm 0,0064$ )	( $\pm 2,286$ )	( $\pm 2,707$ )	( $\pm 4,19$ )
	% de erro do método = 57,64			

Planta controle (sem *Azolla*) utilizada =  $0,644 \pm 0,016$  % át.  $^{15}\text{N}$

Tabela 12 - Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Plantas colhidas aos 63 dias após plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Determinações obtidas através de método direto, onde se utilizou *Azolla caroliniana* marcada (2,81 % át.  $^{15}\text{N}$ ) e solo não marcado.

Dose <i>Azolla</i> (g matéria fresca/ vaso)	% Át. $^{15}\text{N}$	%NPA	QNPA (mg/vaso)	% Recuperação N proveniente <i>Azolla</i>
10	0,456	3,68	7,36	15,09
	0,456	3,68	6,26	12,74
	0,460	3,85	6,54	12,41
	0,457	3,72	5,58	11,60
	0,451	3,48	4,87	13,85
	$\bar{M}=0,456$	$\bar{M}=3,68$	$\bar{M}=6,122$	$\bar{M}=13,14$
	( $\pm 0,0029$ )	( $\pm 0,1187$ )	( $\pm 0,847$ )	( $\pm 1,36$ )
	% de erro do método = 10,33%			
20	0,507	5,77	7,50	7,86
	0,518	6,22	11,20	11,24
	0,538	7,04	11,97	12,28
	0,520	6,30	8,82	8,96
	0,547	7,41	11,86	11,72
	$\bar{M}=0,526$	$\bar{M}=6,55$	$\bar{M}=10,27$	$\bar{M}=11,05$
	( $\pm 0,0145$ )	( $\pm 0,593$ )	( $\pm 1,792$ )	( $\pm 1,46$ )
	% de erro do método = 13,18%			

Planta controle (sem *Azolla*) utilizada =  $0,371 \pm 0,002$  % át.  $^{15}\text{N}$ .

Tabela 13 - Recuperação pelo arroz de nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Peso da matéria seca (g/vaso); N-total (mg/vaso) e nitrogênio derivado da *Azolla* (mg/vaso) de plantas colhidas aos 63 dias após o plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Método indireto, onde se utilizou solo marcado (0,7% át.  $^{15}\text{N}$ ) e *Azolla caroliniana* não marcada.

Dose N (g <i>Azolla</i> )	Peso matéria seca (g/vaso)	N-total (mg/vaso)	QNPA (mg/vaso)
0	6,77	91,39	
	9,56	100,38	
	8,52	79,24	
	11,78	90,56	
	8,53	94,68	
$\bar{M}$	8,91 ( $\pm 1,446$ )	91,25 ( $\pm 6,93$ )	
10	9,61	136,46	2,52
	10,08	150,19	7,02
	8,36	91,12	8,41
	8,90	121,93	2,16
	9,22	130,92	-
$\bar{M}$	9,23 ( $\pm 0,589$ )	126,12 ( $\pm 19,758$ )	5,03 ( $\pm 2,735$ )
20	7,06	111,83	2,34
	10,16	130,05	7,91
	8,80	110,88	3,56
	9,10	88,27	8,63
	9,82	122,75	-
$\bar{M}$	9,15 ( $\pm 0,807$ )	112,76 ( $\pm 14,163$ )	5,62 ( $\pm 2,707$ )

Tabela 14 - Recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo. Peso da matéria seca (g/vaso); N-total (mg/vaso) e nitrogênio derivado da *Azolla* (mg/vaso) de plantas colhidas aos 63 dias após o plantio, desenvolvidas em casa-de-vegetação (5 plantas/vaso). Método direto, onde se utilizou *Azolla caroliniana*, marcada (2,81% át.  $^{15}\text{N}$ ) e solo não marcado.

Dose N (g <i>Azolla</i> )	Peso matéria seca (g/vaso)	N-total (mg/vaso)	QNPA (mg/vaso)
0	9,43	184,83	
	9,15	118,95	
	10,12	126,50	
	8,53	112,60	
	9,92	113,09	
$\bar{M}$	9,43 ( $\pm 0,566$ )	131,19 ( $\pm 27,285$ )	
10	11,21	201,78	7,36
	10,71	170,29	6,26
	10,64	158,54	6,54
	10,23	153,45	5,58
	8,97	139,93	4,87
$\bar{M}$	10,35 ( $\pm 0,758$ )	164,80 ( $\pm 20,901$ )	6,12 ( $\pm 0,847$ )
20	8,33	134,11	7,50
	9,36	177,84	11,20
	11,44	171,60	11,97
	8,69	139,91	8,82
	11,28	155,66	11,86
$\bar{M}$	9,82 ( $\pm 1,301$ )	155,82 ( $\pm 17,078$ )	10,27 ( $\pm 1,792$ )

## 5. DISCUSSÃO

Antes de uma utilização efetiva da *Azolla* como adubo verde para o arroz numa determinada região, torna-se necessário um programa de seleção de espécies mais produtivas e adaptadas, para que o produtor possa se beneficiar do potencial máximo da associação. Para uma seleção eficiente, os caracteres mais visados objetivando boa qualidade do material segundo GRIST (1979) seriam crescimento rápido com alta produção de biomassa, altas taxas de acúmulo de nitrogênio, adaptabilidade a baixos pHs, baixos teores de fósforo e altas temperaturas, entre outros.

A atividade da enzima nitrogenase poderia ser um fator a se considerar na seleção de espécies de *Azolla*. Porém, trata-se de um parâmetro que dificilmente expressa o potencial real da associação, devido as variações existentes na atividade da enzima durante períodos diários, sazonais e mesmo

durante seu ciclo de desenvolvimento. Há autores como LUMPKIN e PLUCKNETT (1982), que sugerem que não devem ser utilizados valores da atividade da nitrogenase para avaliar-se potencial das espécies de *Azolla* mas apenas como um parâmetro auxiliar, de correlação com o teor de N-total ou com fatores do meio.

Ao lado das críticas que são feitas aos resultados pouco seguros que a atividade da enzima traz, está a problemática da metodologia a ser adotada para sua medida pois não há, na pesquisa, uma padronização de métodos.

O presente trabalho propôs uma metodologia de avaliação da atividade da nitrogenase "in situ". O sistema "intacto", ou seja, um sistema onde a atividade é mensurada nos próprios vasos onde as plantas normalmente se desenvolvem, mostrou-se viável, apresentando um erro da ordem de 4%, para 30 minutos de incubação.

Deve-se, frisar porém, que as medidas obtidas com este método não devem ser extrapoladas para todo um período, ou mesmo para todo um ciclo de desenvolvimento (FAO / IAEA, 1982). São resultados momentâneos, válidos apenas para o curto espaço de tempo em estudo, e obtidos em condições de casa-de-vegetação.

Com o estudo da luz e temperatura diurna influenciando a atividade da nitrogenase, foi possível determinar-se o horário de máxima atividade da enzima, padronizando desta forma o horário para as determinações, em todos os ensaios subsequentes.

Através de ensaios sobre fatores do meio ambiente que influenciam a associação simbiótica *Azolla-Anabaena*, obteve-se algumas informações básicas importantes.

Diferentes respostas fornecidas pelas diversas espécies de *Azolla* nos 3 níveis de pH estudados, podem ser consideradas úteis para obter plantas tolerantes a baixo pH, pois apesar da tendência que existe de solos inundados estabilizarem seu pH entre 6,5 e 7,0, indiferentemente destes serem ácidos ou básicos antes da inundação, a lâmina d'água desses solos tendem a apresentar um pH sempre um pouco mais baixo (PONNAMPERUMA, 1977).

Estudos sobre crescimento e fixação biológica de N da *Azolla* em presença de N-combinado devem ser desenvolvidos uma vez que esse elemento se encontra sempre presente em solos cultivados com arroz, dada a sua alta exigência por este nutriente. Nesse trabalho verificou-se que doses de N-combinado promoveram diferenças significativas na produção da biomassa da *Azolla* independentemente da fonte utilizada.

A marcação da *Azolla caroliniana* foi feita em solução nutritiva contendo 100 ppm de N na forma de uréia enriquecida a 4% átomos de  $^{15}\text{N}$ . Através do método da diferença, estimou-se a porcentagem de N proveniente da fixação. Entretanto, segundo Boletim da FAO/IAEA (1982) e WATANABE (1983), essa determinação é mais precisa quando se utiliza uma planta "não fixadora de N", como controle, ou então, pelo método direto, através de atmosfera marcada com  $^{15}\text{N}_2$ .



Após a obtenção do material marcado (*Azolla caroliniana*), fez-se a incorporação deste ao solo e, através de 2 métodos, obteve-se taxas de recuperação do N da *Azolla* pela planta do arroz.

Os dois métodos utilizados mostraram taxas de recuperação do nitrogênio da *Azolla* incorporada por volta de 13%, embora o método direto (no qual utilizou-se *Azolla* marcada) tenha mostrado uma precisão muito maior, com erro ao redor de 10,33% entre as suas repetições.

O método indireto, com o uso de solo marcado, foi testado para checar a possibilidade de sua utilização para as determinações desejadas no presente trabalho. Os resultados obtidos indicaram ser este um método pouco confiável, devido ao alto percentual de erro observado (48,24%), não sendo portanto, recomendada a sua utilização.

O método direto mostrou maior precisão nas medidas e pode ser recomendado para este tipo de estudo.

FREITAS (1984), utilizando solo marcado através da decomposição de matéria orgânica vegetal de milho, que acusava uma marcação de 49% átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso, obteve, após a estabilização do  $^{15}\text{N}$  adicionado, uma taxa de recuperação, através de amostragens do próprio solo, de 79,1%. Este resultado pode ser uma indicação de que, o uso de quantidades maiores de matéria orgânica incorporada ao solo marcado com  $^{15}\text{N}$ , pode promover uma menor diluição do nitrogênio adicionado, melhorando, assim, a confiabilidade do método do solo marcado.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais obtidos, as seguintes conclusões podem ser ressaltadas:

- . Há a necessidade de uma padronização na metodologia para análise da atividade da nitrogenase no sistema *Azolla-Anabaena*. A metodologia proposta no presente trabalho pode ser vista como uma opção viável e precisa. Entretanto, devido a variações horárias, periódicas e sazonais na atividade da enzima, estudos futuros que visem aprimoramento de metodologias, devem ser incentivados.
- . Observou-se efeito varietal para pH. *Azolla microphylla* e *Azolla filiculoides*, mostrando-se mais tolerantes a acidez (maior produção de biomassa e acúmulo de nitrogênio nos valores de pH 5,5 e 4,5), enquanto que a *Azolla nilotica* foi a

espécie mais sensível.

A presença de nitrogênio mineral no meio tem efeito inibitório sobre a fixação do  $N_2$  pela *Azolla*, sendo este efeito dependente da fonte e da dose de N. A atividade da nitrogenase e a produção de biomassa da *Azolla caroliniana*, desenvolvida em solução nutritiva acrescida de nitrogênio-combinado, foram prejudicadas, porém não foram suprimidas.

- . Uréia adicionada à solução nutritiva constituiu-se numa eficiente forma de marcação da *Azolla caroliniana*. Com a utilização de 100 ppm de N, na forma de uréia a 4% át.  $^{15}N$ , em solução de Hoagland, foi possível obter *Azolla* marcada a 2,81% át.  $^{15}N$ , com uma recuperação de 71,34% do nitrogênio acrescentado à solução. A produção de biomassa foi um pouco prejudicada, porém houve marcação adequada.
- . Houve recuperação pelo arroz do nitrogênio da *Azolla* incorporada ao solo da ordem de 13%, para dose menor e 11% quando se usou doses maiores de *Azolla*. O método direto, que utilizou *Azolla caroliniana* marcada com  $^{15}N$  e incorporada ao solo foi o melhor, apresentando um percentual de erro na medida de 10% e 13%, respectivamente, para as doses mais baixa e mais alta de *Azolla* incorporada. Sua utilização é recomendada para este tipo de estudo.

## 7. LITERATURA CITADA

ASHTON, P.V., 1974. The effects of some environmental factors on the growth of *Azolla filiculoides* Lam. In: The Oranger River Progress Report (Inst. for Envir. Sci.). University of the O.F.S. Boem Foutain, South Africa. 123-138p.

ASHTON, P.V. e R.D. WALMSLEY, 1976. El helecho acuatico *Azolla* y su simbiote *Anabaena*. Endeavour. XXXV(124): 39-43.

BECKING, J.H., 1976. Nitrogen fixation in some natural ecosystems in Indonesia. In: NUTMAN, O.S. Org. (ed.). Symbiotic nitrogen fixation in plants. IBP, 7: 539-550.

- BECKING, J.H., 1979. Environmental requirements of *Azolla* for use in tropical rice production. In: Nitrogen and Rice. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. p.345-374.
- BECKING, J.H. e M. DONZE, 1981. Pigment distribution and nitrogen fixation in *Anabaena azollae*. Plant and Soil, 61: 203-226.
- BONE, D.H., 1972. The influence of canavanine, oxygen and urea on the steady-state levels of nitrogenase in *Anabaena flos-aquae*. Arch. Microbiol., 86: 13.
- BREMNER, J.M., 1975. Use of nitrogen-tracers techniques for research on nitrogen-fixation. In: AYANABA, A. e P.J. DART (eds.). Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. New York, John Wiley. p.335-352.
- BROTONEGRO, S. e S. ABSULKADIR, 1976. Growth and nitrogen - fixing activity of *Azolla pinnata*. Ann. Bogor., 6: 69-123.
- BUCKINGHAM, K.W.; S.W. ELA; J.G. MORRIS e C.R. GOLDMAN, 1978. Nutritive value of nitrogen-fixing aquatic fern, *Azolla filiculoides*. J. Agric. Food Chem., 26: 1230-1234.

CHU, LIU CHUNG, 1979. Use of *Azolla* in Rice production in China. In: Nitrogen and Rice. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. p.275-394.

FAO. SOILS BULLETIN, 1978. China. *Azolla* propagation and small-scale biogas technology, p.1-20.

FAO/IAEA, 1982. Consultants meeting on the role of isotopes in studies on nitrogen fixation and nitrogen cycling by Blue-Green algae and their Associations. October 11-15, Vienna, Austria.

FIORE, M.F.; A.P. RUSCHEL e J.R. FREITAS, 1979. Utilização de  $^{15}\text{N}$  para avaliação do nitrogênio fixado em *Azolla-Anabaena*. In: Seminário Regional sobre o uso de técnicas nucleares em estudos das relações solo-planta-atmosfera, CENA, Piracicaba, SP.

FIORE, M.F. e A.P. RUSCHEL, 1981. Nitrogen fixation by *Azolla-Anabaena* in culture solution. In: VOSE, P.B. e A.P. RUSCHEL, eds. Associative  $\text{N}_2$ -fixation. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, V.2, p.213-217.

FIORE, M.F., 1984a. Fixação Biológica de  $\text{N}_2$  em arroz irrigado. In: I Curso de Produção de Arroz. EMBRAPA. Goiânia, 9 a 27 de janeiro de 1984. 40p.

FIORE, M.F., 1984b. Efeito da utilização da *Azolla* na produção de arroz irrigado. Pesq. agropec. bras., 19(3): 387-390.

FIORE, M.F. e K.G. GUTBROD, 1985. Use of *Azolla* in Brazil (Paper presented). In Workshop on *Azolla* use, 31 March - 05 April, 1985. Fuzhou, China, 10p.

FREITAS, J.R., 1984. Dinâmica do nitrogênio em um solo Terra Roxa Estruturada (TRE) tratado com matéria orgânica vegetal e sulfato de amônio enriquecidos com o isótopo  $^{15}\text{N}$ . ESALQ, USP, Piracicaba, 113p. [Dissertação de Mestrado].

FRIED, M. e H. BROESHART, 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil. The Hague, 43: 707-711.

GRIST, D.H., 1979. Common paddy plant fixes nitrogen needs. Third World Agriculture, 1(2): 14-15.

GUTBROD, K.G., 1984. Produtividade de arroz irrigado com aplicação de *Azolla* como fonte de nitrogênio. ITEM - Irrigação e Tecnologia Moderna, 19: 4-6.

HARDY, R.W.F.; R.D. HOLSTEN; E.K. JACKSON e R.C. BURNS, 1968. The acetylene-ethylene assay for  $\text{N}_2$  fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol, 43: 1185-1207.

- HASELKORN, R., 1978. Heterocysts. Ann. Rev. Plant Physiol., 29: 319-344.
- HILL, D.J., 1977. The Role of *Anabaena* in the *Azolla* - *Anabaena* symbiosis. New Phytol., 78: 611-616.
- HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON, 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Exp. Sta., Circ. 347p.
- HOLST, R.W. e J.H. YOPP, 1976. Effect of light quantity, osmotic stress, temperature and pH on nitrogen fixation and nitrate reduction by the *Azolla* - *Anabaena* symbiosis. Plant. Physiol., 57: 103.
- JUNK, W.J., 1979. Macrófitas aquáticas nas várzeas da Amazônia e possibilidades do seu uso na agropecuária. Inst. Pesq. da Amaz./Cons. Nac. de Des. Cient. e Tecn., Manaus, Amazonas, 23p.
- LAMBORG, M.R., 1977. The role of blue-green algae enhancing crop production. In: HOLLAENDER, A. org. (ed.). Report of the public meeting on genetic engineering for nitrogen fixation. National Science Foundation, 56-60.



- LUMPKIN, T.A. e D.L. PLUCKNETT, 1982. *Azolla* as a green manure: use and management in crop production. Westview Press/ Boulder, Colorado, 229p.
- MALAVOLTA, E.; W.R. ACORSI; A.P. RUSCHEL; F.J. KRUG; L.I. NAKAYAMA e I. EIMORI, 1981. Mineral Nutrition and N<sub>2</sub>-Fixation in *Azolla*. In: VOSE, P.B. e A.P. RUSCHEL (eds.). Associative N<sub>2</sub>-fixation. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, V.2. p.205-211.
- MARGHERI, M.C.; L. TOMASELLI e C. FILPI, 1984. Research on the mass culture of *Azolla caroliniana* e *A. filiculoides* in Italy. In: SILVER, W.S. e E.C. SCHRÖDER (eds.). Practical Application of *Azolla* for Rice Production. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Dor Urecht/Boston/Lancaster. p.212-213.
- MOORE, A.W., 1969. *Azolla*: Biology and agronomic significance. The Botanical Review, 35: 17-35.
- NEWTON, J.W., 1976. Photoproduction of molecular hydrogen by a plant-algae symbiotic system. Sci., 191: 559-560.
- NEWTON, J.W. e J.F. CAVINS, 1976. Altered nitrogenous pools induced by the aquatic fern *Azolla-Anabaena*. Plant Physiol., 6: 798-799.

- NEWTON, J.W. e E.S. SELKE, 1981. Assimilation of ammonia by the *Azolla-Anabaena* symbiosis. Journal of Plant Nutrition, 3(5): 803-811.
- NOLDIN, J.A. e M.G. RAMOS, 1983. Períodos de cultivo da *Azolla* e seus efeitos sobre o rendimento do arroz irrigado em Santa Catarina. In: Anais da 12ª Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 21-23 set. 1983. Inst. Riogrand. do Arroz, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p.109-111.
- NICKELL, L.G., 1961. Physiological studies with *Azolla* under aseptic conditions. II. Nutritional studies and the effects of the chemicals on growth. Phyton, 17: 49-54.
- OLSEN, C., 1972. On biological nitrogen fixation in nature, particularly in blue-green algae. Compt. Rend. Trav. Carlsberg Lab., 37(12): 269-283.
- OES, A., 1913. Über die assimilation des freien stickoffs durch *Azolla*. Z. Bot., 5: 145-163.
- PETERS, G.A. e B.C. MAYNE, 1974a. The *Azolla-Anabaena* relationship. 1. Initial characterization of the association. Plant Physiol., 53: 813-819.

- PETERS, G.A. e B.C. MAYNE, 1974b. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. II. Localization of nitrogenase activity as assayed by acetylene reduction. Plant Physiol., 53: 820-824.
- PETERS, G.A., 1975. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. III. Studies on metabolic capabilities and a further characterization of the simbiote. Arch. Microbiol., 103(2): 113-122.
- PETERS, G.A.; W.R. EVANS e R.E. TOIA, Jr., 1976. *Azolla-Anabaena azollae* relationship. IV. Photosynthetically-driven, nitrogenase - catalyzed H<sub>2</sub> production. Plant Physiol., 58: 119-126.
- PETERS, G.A.; R.E. TOIA, Jr. e S.M. LOUGH, 1977. *Azolla-Anabaena azollae* relationship. V. <sup>15</sup>N<sub>2</sub> fixation, acetylene reduction, and H<sub>2</sub> production. Plant Physiol., 59: 1021-1025.
- PETERS, G.A., 1978a. The *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. In: HOLLAENDER, A., org. Genetic engineering for nitrogen fixation. Basic Life Science, 9: 231-258.
- PETERS, G.A., 1978b. Blue-green algae and algae association. BioScience, 28: 580-585.

PETERS, G.A.; B.C. MAYNE; T.B. RAY e R.E. TOIA, Jr., 1979.

Physiology and biochemistry of the *Azolla-Anabaena* symbiosis.  
In: Nitrogen and rice. International Rice Research Institute.  
Los Baños, Phillipines. p.325-344.

PETERS, G.A.; R.E. TOIA, Jr.; W.R. EVANS; D.K. CRIST; B.C.

MAYNE e R.E. POOLE, 1980a. Characterization and comparison  
of five  $N_2$ -fixing *Azolla-Anabaena* associations. I. Optimati-  
zation of growth conditions for biomass increase and N  
content in a controlled environment. Plant, Cell and  
Environment, 3: 261-269.

PETERS, G.A.; T.B. RAY; B.C. MAYNE e R.E. TOIA, Jr., 1980b.

*Azolla-Anabaena* association. I. Morphological and physiological  
studies. In: NEWTON, W.E. e W.H. ORME JOHNSON (eds.).  
Nitrogen Fixation, Vol. 2. Baltimore University Parts Press,  
p.243-309.

PETERS, G.A.; O. ITO, V.V.S. TYAGI; B.C. MAYNE; D. KAPLAN e H.E.

CALVERT, 1981. Photosynthesis and  $N_2$  fixation in the *Azolla-*  
*Anabaena* symbiosis. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON, eds.  
Current Perspectives in nitrogen fixation. Canberra: Austra-  
lian Academy of Sciences. p.121-124.

- PETERS, G.A. e H.E. CALVERT, 1983. The *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. In: Linda J. Goff (ed.). *Algae Symbiosis*, Cambridge University Press, USA.
- PETERS, G.A. e O. ITO, 1984. Determining N<sub>2</sub> fixation and N input in *Azolla* grown with and without combined nitrogen sources keeping the acetylene reduction assay in the proper perspective. In: SILVER, W.S. e E.C. SCHRÖDER (eds.), *Practical Application of Azolla for Rice Production*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Dor Urecht/Boston/Lancaster. p.29-39.
- PONNAMPERUMA, F.N., 1977. Physicochemical properties of submerged soils in relation to fertility. IRPS nº 5. The International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. 32p.
- RAINS, D.W. e S.N. TALLEY, 1979. Use of *Azolla* in North America. In: Nitrogen and Rice. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. p.419-431.
- RAY, T.B.; G.A. PETERS; R.F. TOIA, Jr. e B.C. MAYNE, 1978. *Azolla-Anabaena* relationship. VII. Distribution of ammonia-assimilating enzymes, protein, and chlorophyll between host and symbiont. Plant Physiol., 62: 463-467.

- RAY, T.B.; B.C. MAYNE; R.E. TOIA, Jr. e G.A. PETERS, 1979. *Azolla-Anabaena* relationship. VIII. Photosynthetic characterization of the association and individual partners. Plant Physiol., 64: 791-795.
- SAITO, S.M.T.; E. MATSUI e E. SALATI, 1980.  $^{15}\text{N}_2$  fixation,  $\text{H}_2$  evolution and  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction relationship in *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol., 49: 37-42.
- SAUBERT, G.G.P., 1949. Provisional communication on the fixation of elementary nitrogen by a floating fern. Ann. Royal Bot. Gard. (Buitenzorex), 51: 177-197.
- SEHEM, A., 1979. Salvináceas. P.R. REITZ, ed. Itajaí, Santa Catarina. 11p. [Flora Ilustrada Catarinense, 1ª parte].
- SHI DIN-JI, LI VIA-GE; ZHONG ZE-PU; WONG FA-ZHU; ZHU LI-PING e G.A. PETERS, 1981. Studies on nitrogen fixation and photosynthesis in *Azolla imbricata* (ROXB) and *Azolla filiculoides* Lam. Acta Botanica Sinica, 23(4): 306-315.
- SINGH, P.K., 1977. *Azolla* plants as fertilizer and feed. Indian Farming, 27: 19-22.

- SINGH, P.K., 1979. Use of *Azolla* in India. In: The International Rice Research Conference, IRRI, Philippines, April 16-20, 23p.
- STANIER, R.Y.; R. KUNISAWA; M. MANDEL e G. COHEN-BÁZIRE, 1971. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). Bacteriological Reviews, 35(2): 171-205.
- STEWART, S.D.P., 1973. Nitrogen fixation. In: The biology of blue-green algae. CARR, N.G. e B.A. WHITON, eds. Botanical Monographs, vol. 9. Blackwell Scientific Publications. Edinburgh. Australia. 260-267.
- STEWART, W.D.P.; M.J.A.M. SAMPAIO; A.O. ISICHER e R. SILVESTER-BRADLEY, 1978. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen in Tropics. DOBEREINER, J. (ed.). Basic Life Sciences, 10, Plenum Press, N.Y. 41-63.
- STEWART, W.D.P., 1978. Nitrogen-fixing cyanobacteria and their associations with eukaryotic plants. Endeavour, New Series, 2(4): 170-179.
- SUBUDHI, B.P.R. e I. WATANABE, 1979. Minimum level of phosphate in water for growth of *Azolla* determined by continuous flow culture. Curr. Sci., 48(24): 1065-1066.

- TALLEY, S.N.; E. LIM e D.W. RAINS, 1977. Application of *Azolla* in crop production. In: BUI, H.D. e MGUYGEN, T.N. Practice of *Azolla* fertilization in Vietnan. Unpublished IRRI Memo based on a visit to IRRI between 15 and 24 April.
- TALLEY, S.N. e D.W. RAINS, 1980. *Azolla* as a nitrogen source for temperate rice. In: NEWTON, W.E. e W.H. ORME-JOHNSON (eds.). Nitrogen Fixation, vol. 2. Baltimore University Park Press, p.311-320.
- TRIVELIN, P.C.O.; E. SALATI e E. MATSUI, 1973. Preparo de amostras para análises de  $^{15}\text{N}$  por espectrometria de massa. Boletim Técnico nº 002. CENA-USP. Piracicaba, SP. 41p.
- TYAGI, U.U.S.; T.B. RAY; B.C. MAYNE e G.A. PETERS, 1981. The *Azolla*-*Anabaena azollae* relationship. XI. Phycobiliproteins in the action spectrum for nitrogenase-catalyzed acetylene reduction. Plant Physiol., 68: 1479-1484.
- VAN HOVE, C. e LOPEZ F., Y., 1983. Fisiologia de *Azolla*. In: Curso sobre la utilización de *Azolla* en Latino-America Tropical, 17-23 April, 56p.
- VARGHESE, T.J.; K.V. DEVARAJ e B. SHANTHARAM, 1976. Relative growth of the grass carp *Ctenopharygodon idella* (Val.) fed *Utricularia* and a mixture of *Azolla* and *Lemna*. J. Inland Fish. Soc. India, 8: 206-211.



- VENKATARAMAN, A., 1980. *Azolla* propagation in China. In: A-zolla as a biofertilizer. Tamilnadu Agric. Univ. India. p.1-6.
- VOSE, P.B.; A.P. RUSCHEL; R.L. VICTÓRIA; S.M.T. SAITO e E. MATSUI, 1981. 15-nitrogen as a tool in biological nitrogen fixation research. In: International Workshop on Biological Nitrogen Fixation Technology.
- WALMSLEY, R.D.; C.M. BREEN e E. KYLE, 1973. Aspects of the fern-alga relationship in *Azolla filiculoides*. Limnol. Society South Africa Newsl., 20: 13-21.
- WATANABE, I.; C.R. ESPINAS; N.S. BERJA; B.V. ALIMAGNO, 1977. Utilization of the *Azolla-Anabaena* complex as a nitrogen fertilizer for rice. IRPS n° 11, The International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 15p.
- WATANABE, I., 1978. *Azolla* and its use in lowland rice culture. Tsuchi Biseibutsu, 20: 1-10.
- WATANABE, I.; N.S. BERJA e D.C. DEL ROSARIO, 1980. Growth of *Azolla* in paddy field as affected by phosphorus fertilizer. Soil Sci. Plant Nutr., 26(2): 301-307.

WATANABE, I.; B. KE-ZHI; N.S. BERJA; C.R. ESPINAS; O. ITO e B.P.R. SUBUDHI, 1981. The *Azolla-Anabaena* complex and its use in Rice Culture. IRRI Research Paper Series: n° 69, November. The International Rice Research Institute. Manila Philippines, 11p.

WATANABE, I., 1983. Nitrogen fixation by *Azolla-Anabaena* symbiosis (Contribution of  $N_2$  fixation to N nutrition of *Azolla* growing in soil). IRRI Annual Report ofr 1983. p.281-283.

YATAZAWA, M.; N. TOMOMATSU; HOSODA e K. NUNOME, 1980. Nitrogen fixation in *Azolla-Anabaena* symbiosis as affected by mineral nutrient status. Soil Sci. Plant Nutr., 26(3): 415-426.