

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 14

Campinas, novembro de 1954

N.º 1

A FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO DO AR PELAS BACTÉRIAS QUE VIVEM ASSOCIADAS COM AS LEGUMINOSAS CROTALÁRIA E MUCUNA (*)

R. A. CATANI, H. GARGANTINI e J. ROMANO GALLO, *engenheiros agrônomos, Secção de Agrogeologia, Instituto Agrônomo*

RESUMO

Com a finalidade de conhecer a quantidade de nitrogênio fixado simbioticamente por crotalária (*Crotalaria juncea*, L.) e mucuna anã (*Stizolobium deeringianum*, Bart.) e a influência de alguns fatores sobre o fenômeno, instalou-se uma experiência em vasos de Mitscherlich contendo solo tipo terra roxa misturada. Os tratamentos empregados foram os seguintes: 1) testemunha; 2) NPK; 3) NPK + calcário; 4) NPK + inoculante; 5) NPK + calcário + inoculante; 6) PK + calcário; 7) PK + calcário + inoculante.

Dois meses após a germinação das sementes colheu-se o material para análise, dosando-se o N nas raízes e nas partes vegetativas das plantas.

Nessa ocasião foram tiradas diversas fotografias, para documentação comparativa da nodulação das raízes nos diversos tratamentos.

1 - INTRODUÇÃO

As primeiras observações sobre a possível fixação do nitrogênio do ar pelas leguminosas foram feitas por Davy em 1813, conforme cita Waskman (8). Em 1837-38, Boussingault verificou experimentalmente que a cultura de leguminosas fornecia um acréscimo no nitrogênio do solo e calculou a quantidade de N acrescida por acre.

Entretanto, desde as observações e dados obtidos pelos dois pesquisadores pioneiros neste assunto, Davy e Boussingault, até a descoberta do agente responsável pela fixação, por Beijerinck em 1888, houve um período de muita controvérsia e especulação.

Depois da descoberta das bactérias que vivem associadas às leguminosas, os trabalhos publicados sobre a fixação simbiótica do nitrogênio do ar têm sido numerosos. Atualmente, sabe-se que os microorganismos que tomam parte no fenômeno e que vivem em simbiose com as leguminosas pertencem ao gênero *Rhizobium*.

(*) Trabalho apresentado ao II Congresso Panamericano de Agronomia, realizado em Piracicaba e São Pedro, de 29 de março a 6 de abril de 1954.

Recebido para publicação em 31 de julho de 1954.

A quantidade de nitrogênio fixada pelas bactérias que vivem associadas às leguminosas é variável e depende de muitos fatores, como espécie da leguminosa, condições do solo, natureza da bactéria, etc.

Sobre este assunto a bibliografia é bastante extensa (1, 3, 4, 5, 6, 8).

Consultando apenas os trabalhos mais importantes para o que se tem em vista com o presente estudo, verifica-se que Lyon e Bizzell, em experiências que duraram 10 anos, estabeleceram uma comparação entre a quantidade de nitrogênio fixada através da cultura de alfafa e outras leguminosas; enquanto a alfafa fixou 281 quilos de N por hectare e por ano, diferentes trevos (*Melilotus sp.*), fixaram de 157 a 188 kg de N e a soja alcançou 118 kg de N por hectare e por ano (4).

Chapman e colaboradores (2), em experiências em lisímetros e durante 10 anos, concluíram que a "purple vetch" (*Vicia atropurpurea*) e um dos trevos (*Melilotus indica*), fixaram aproximadamente 170 kg de N por hectare e por ano.

Nas regiões tropicais e sub-tropicais os dados relativos à fixação de nitrogênio por microorganismos simbióticos e não simbióticos são muito escassos.

No Estado de São Paulo, apesar de já serem conhecidos os resultados benéficos determinados pela cultura de leguminosas em rotação com outras plantas de valor econômico, não se conhece, entretanto, a quantidade fixada desse elemento.

O presente trabalho teve por objetivo estudar em vasos, e em caráter preliminar, a fixação simbiótica do nitrogênio, através de leguminosas bem adaptadas às condições do Estado de São Paulo.

2 - MATERIAL E MÉTODO

O ensaio foi instalado em vasos de Mitscherlich esmaltados e constou de sete tratamentos e três repetições para cada uma das leguminosas estudadas: mucuna anã, *Stizolobium deeringianum*, Bart. e crotalária, *Crotalaria juncea*, L.

Os vasos foram cheios com terra roxa misturada, procedente da Estação Experimental Central do Instituto Agrônomo, em Campinas, retirada à profundidade de 0 — 20 cm. Cada vaso recebeu 6 kg de terra previamente seca ao ar e passada na peneira de 2 mm. O solo, analisado, apresentou as seguintes características:

pH internacional	5,30				
Carbono (C)	4,06	%			
Nitrogênio (N)	0,140	%			
PO ₄ (1)	0,13		e. mg/100 g de solo seco		
K ⁺ trocável	0,18		e. mg	"	"
Ca ⁺⁺ trocável	3,63		e. mg	"	"
Mg ⁺⁺ trocável	0,87		e. mg	"	"
H ⁺ trocável	5,40		e. mg	"	"

(1) PO₄ fracamente adsorvido, extraído com solução de NH₄F 0,025 N e H₂ SO₄ 0,05 N.

Os tratamentos foram os seguintes : 1) testemunha geral (sem adubo) ; 2) NPK ; 3) NPK + calcário ; 4) NPK + inoculante ; 5) NPK + calcário + inoculante ; 6) PK + calcário ; 7) PK + calcário + inoculante.

Foram adicionados por vaso, nos tratamentos em que entrou o elemento, 2,0 g de N, 2,2 g de P_2O_5 e 3,0 g de K_2O , respectivamente na forma de NH_4NO_3 , K_2HPO_4 e KCl em solução. O calcário, nos tratamentos 3, 5, 6 e 7 foi bem misturado com os 6 kg de terra, em bandeja à parte e antes da aplicação do adubo, de forma a manter um contacto o mais perfeito possível das partículas de calcário com o solo, enchendo-se, em seguida, os vasos correspondentes com a terra assim tratada. Foi utilizado um calcário dolomítico sedimentar, com um grau de finura dado pela peneira 50 (0,3 mm de abertura de malha) e na base de 15 g por vaso, quantidade esta calculada como suficiente para elevar a 60% a saturação em bases do solo. A composição química do calcário revelou os seguintes teores : CaO, 28,6% ; MgO, 17,4% ; $CaCO_3$ equivalente 94,17%.

A sementeação foi feita em 11 de novembro de 1953, utilizando-se 10 sementes por vaso. As sementes de crotalária, nos tratamentos que receberam inoculante, foram inoculadas na proporção de 200 g de inoculante ⁽²⁾ para 50 kg de sementes, e as de mucuna na de 200 g de inoculante para 120 kg de sementes. Umidade favorável no solo foi mantida durante todo o tempo de duração do ensaio, procedendo-se ao retôrno do percolado e seguindo-se, em linhas gerais, a técnica preconizada por Mitscherlich quanto ao contrôle de água.

A crotalária germinou em 15 de novembro e a mucuna em 18 do mesmo mês. No dia 23 de novembro foi feito um desbaste, deixando-se respectivamente quatro plantas de crotalária e três de mucuna por vaso. Aos dois meses aproximadamente (em 12 de janeiro de 1954) procedeu-se à apreciação do desenvolvimento comparativo das plantas, e nessa mesma data foi feita a colheita da parte aérea, cortando-se as plantas rente ao solo. Depois do corte, as raízes foram retiradas dos vasos, cuidadosamente lavadas e fotografadas, observando-se a formação dos nódulos. A parte aérea (hastes e folhas) e as raízes foram sêcas em estufa a 60° C e a massa sêca foi pesada. O N total foi determinado na raiz e parte aérea pelo processo de Kjeldahl. Também foi dosado o N no solo ao término da experiência, nos tratamentos que não receberam êsse elemento.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão expressos no quadro 1.

Os dados dêsse quadro permitem afirmar que as plantas que não receberam nitrogênio em forma de fertilizante forneceram uma produção de massa sêca da parte aérea igual à das que receberam aquele elemento. Aliás, as observações relativas ao desenvolvimento vegetativo das plantas,

⁽²⁾ O inoculante empregado foi *Rhizobium* sp., do grupo da "cowpea", material fornecido pelo eng. agrônomo Cyro G. Teixeira, do Laboratório de Microbiologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

QUADRO 1. — Produções de material séco de três vasos. Percentagem de N total na parte aérea, raízes e no solo, no final do ensaio.

Tratamento	Crotalaria juncea						Mucuna anã					
	Hastes e folhas			Raiz			Hastes e folhas			Raiz		
	Material séco	N no material séco	%	Material séco	N no material séco	%	Material séco	N no material séco	%	Material séco	N no material séco	%
	g			g			g			g		
1 — Testemunha geral	5	3,297		1,5	n. d.	0,140	21	2,016		8,0	2,184	
2 — NPK	(*) 48	2,282		15,0	1,652		81	2,380		19,5	2,576	
3 — NPK + calcário	82	2,023		19,5	1,442		87	3,472		18,0	2,695	
4 — NPK + inoculante	69	1,757		20,0	1,526		80	2,646		20,0	2,576	
5 — NPK + calc. + inoc.	75	1,820		19,5	1,421		88	3,479		16,0	2,667	
6 — PK + calcário	67	1,932		16,0	1,582	0,145	91	3,395		17,5	2,503	0,149
7 — PK + calc. + inoc.	76	2,639		15,0	1,463	0,158	87	3,012		17,0	2,695	0,164

(*) Duas plantas pouco desenvolvidas.

desde a germinação até o corte, esclareceram que o efeito do nitrogênio do fertilizante foi nulo.

O teor em nitrogênio, das plantas que não receberam êsse elemento na forma de fertilizante, mostrou-se praticamente idêntico ao das plantas que o receberam. Aliás, poder-se-ia até concluir que o fertilizante nitrogenado teve um efeito depressivo na porcentagem de nitrogênio na planta, quando se comparam os dados obtidos (% de nitrogênio) no tratamento 7 (PK + + calcário + inoculante) e no tratamento 5 (NPK + calcário + inoculante). Êste fato, isto é, a depressão na porcentagem de nitrogênio fixado, causada por fertilizantes azotados, já foi verificada por Thornton (7), usando nitrogênio radioativo N^{15} .

A nodulação acompanhou, em linhas gerais, o desenvolvimento da parte aérea e da porcentagem de nitrogênio nas plantas. As figuras 1 e 2 reúnem as fotografias das raízes da crotalária e da mucuna respectivamente. A observação dos nódulos da crotalária na figura 1 é um tanto difícil, porque os nódulos são individuais, pequenos, e também porque as raízes das quatro plantas ficaram tão emaranhadas que foi impossível separá-las. Na mucuna os nódulos formam aglomerados grandes, tornando-se, assim, bem visíveis. Tanto na crotalária como na mucuna, a maior nodulação foi obtida com o tratamento 7, isto é, PK + calcário + inoculante.

Pelo exame dos dados do quadro 1, verifica-se também que o teor em nitrogênio do solo nos tratamentos 6 (PK + calcário) e 7 (PK + calcário + + inoculante) é igual ou superior ao teor daquele elemento no solo antes da experiência, indicando que o nitrogênio contido nas plantas foi fixado simbioticamente.

4 - CONCLUSÕES

As conclusões mais importantes que os dados obtidos permitem tirar são as seguintes :

a) as plantas que não receberam nitrogênio na forma de fertilizante se desenvolveram tão bem quanto as que receberam êsse elemento ; a produção de massa seca da parte aérea seguiu o mesmo fenômeno, em linhas gerais, isto é, o nitrogênio aplicado na forma de fertilizante não fez falta ;

b) o teor em nitrogênio das plantas, que não receberam êsse elemento na forma de fertilizante, mostrou-se praticamente idêntico ao das plantas que o receberam ;

c) o teor em nitrogênio do solo, nos tratamentos PK + calcário e PK + calcário + inoculante, após o término da experiência, foi igual ou levemente superior ao do solo antes da experiência, indicando que o nitrogênio das plantas foi fixado simbioticamente ;

d) a quantidade média de nitrogênio fixado por vaso (20 cm de diâmetro) no tratamento PK + calcário foi de 0,52 g para a crotalária e 1,18 g para a mucuna, enquanto no tratamento PK + calcário + inoculante a fixação foi de 0,74 g para a crotalária e 1,20 g para a mucuna.

NITROGEN FIXATION BY BACTERIA IN ASSOCIATION WITH CROTALARIA AND VELVET BEAN

SUMMARY

A study was made of nitrogen fixation by bacteria in association with crotalaria (*Crotalaria juncea* L.) and velvet bean (*Stizolobium deeringianum* Bart).

The experiment was performed according to the Mitscherlich pot technique. Three replications of each of the following treatment were made: 1) check; 2) NPK; 3) NPK + limestone; 4) NPK + inoculation; 5) NPK + limestone + inoculation; 6) PK + inoculation; 7) PK + limestone + inoculation. The amount of nitrogen, phosphorus, potassium, and limestone added to the pots that received these elements were as follows: 2.0 g of N in the form of NH_4NO_3 ; 2.2 g of P_2O_5 as K_2HPO_4 ; 3.0 g of K_2O as K_2HPO_4 and KCl; 15 g of a dolomitic limestone in order to increase base saturation in the soil to 60 per cent. Inoculation of the seeds was made with a *Rhizobium* from the cowpea group.

The plants were allowed to grow for two months and were then cut, dried at 60° C, and weighed. The roots were dug, washed carefully, and photographed to show the differences in nodule formation (figures 1 and 2). Nitrogen was determined separately in the stems with leaves and in the roots. This element was also determined in soil samples from treatments n.º 6 and n.º 7 prior to planting and after the plants had been removed from the pots. The data obtained indicated that nitrogen had not been absorbed from the soil.

The amount of nitrogen fixed per pot by the nodule bacteria is given below:

TREATMENT	Nitrogen fixed by	
	Crotalaria (g)	Velvet bean (g)
N.º 6 (PK + limestone)	0,52	1,18
N.º 7 (PK + limestone + inoculation)	0,74	1,20

LITERATURA CITADA

1. CLARK, F. E. Soil microorganisms and plant roots. In Normam, A. G. ed. *Advances in Agronomy*. New York, Academic Press Inc., 1949. v. 1, p. 241-288.
2. CHAPMAN, H. D., LIEBIG, G. F. & RAYNER, D. S. A lysimeter investigation of nitrogen gains and losses under various systems of cover-cropping and fertilization and a discussion of error sources. *Hilgardia* 19:57-128. 1949.
3. ENSMINGER, L. E. & PEARSON, R. W. Soil nitrogen. In Normam, A. G. ed. *Advances in Agronomy*. New York, Academic Press Inc., 1950. v. 2, p. 81-111.
4. LYON, L. T., BUCKMAN, H. O. & CADY, N. The nature and properties of soils. 5.ª edição. New York, The Mac Millan Company, 1942. xvii, 591 p.
5. NORMAN, A. G. Recent advances in soil microbiology. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 11:9-15. 1946.
6. SHIELDS, L. M. Nitrogen sources of seed plants and environmental influences affecting the nitrogen supply. *Bot. Rev.* 19:321-376. 1953.
7. THORNTON, G. D. Green-house studies of nitrogen fertilization of soybeans and lespedeza, using isotopic nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 11:249-251. 1946.
8. WAKSMAN, S. A. *Soil Microbiology*. New York, Wiley and Sons, 1952. vii, 356 p.

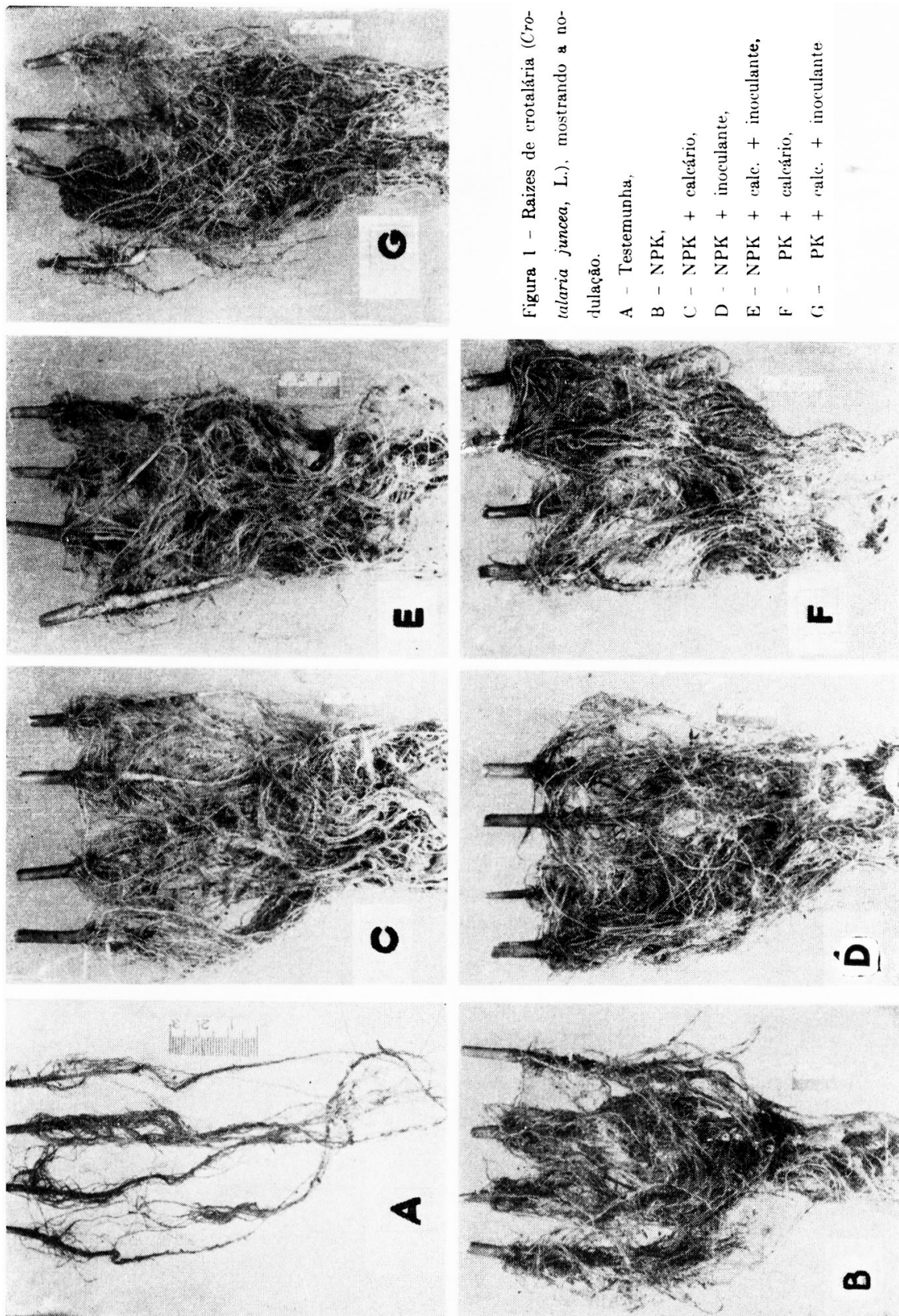


Figura 1 - Raízes de crotalária (*Crotalaria juncea*, L.), mostrando a nodulação.

- A - Testemunha,
- B - NPK,
- C - NPK + calcário,
- D - NPK + inoculante,
- E - NPK + calc. + inoculante,
- F - PK + calcário,
- G - PK + calc. + inoculante

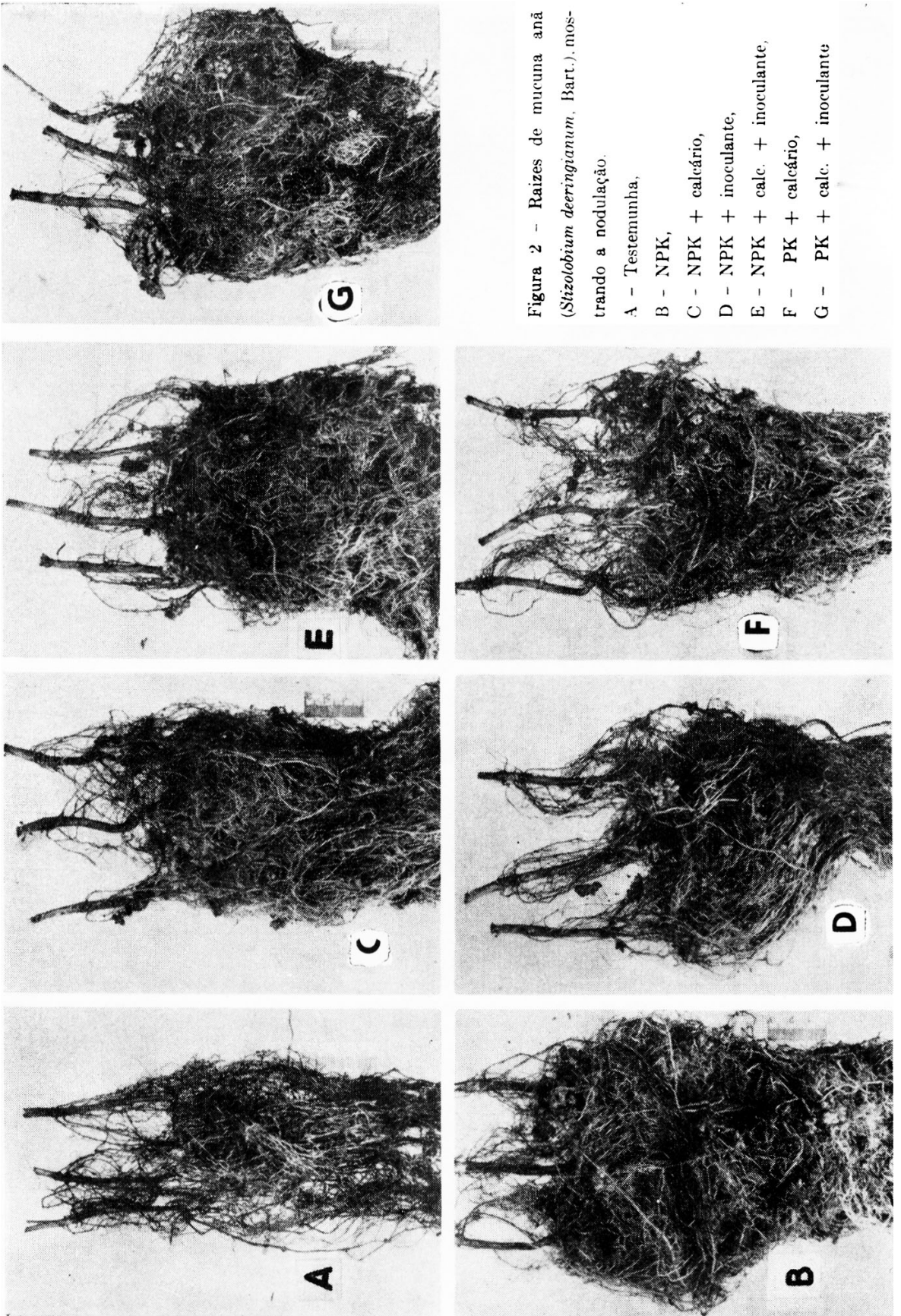


Figura 2 - Raízes de mucuna anã (*Stizolobium deeringianum*, Bart.), mostrando a nodulação.

- A - Testemunha,
- B - NPK,
- C - NPK + calcário,
- D - NPK + inoculante,
- E - NPK + calc. + inoculante,
- F - PK + calcário,
- G - PK + calc. + inoculante