

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 22

Campinas, novembro de 1963

N.º 58

FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO DO AR PELAS BACTÉRIAS QUE VIVEM EM SIMBIOSE COM AS RAÍZES DA CENTROSEMA (1)

J. CASADO MONTOJOS e H. GARGANTINI, engenheiros-agrônomos, Seção de Fertilidade do Solo, Instituto Agrônômico

RESUMO

Continuando a série de trabalhos sobre a quantidade de nitrogênio atmosférico fixada por bactérias que vivem em simbiose com raízes de leguminosas, são relatados os resultados encontrados em centrosema (*Centrosema pubescens* Benth).

Foram utilizados vasos de Mitscherlich, com terra-roxa-misturada. A colheita das plantas foi efetuada por ocasião do florescimento. A parte aérea foi pesada para cálculo da quantidade de massa verde produzida, e, em seguida, juntamente com as raízes, seca a 60°C até peso constante.

Determinaram-se os teores de nitrogênio na parte aérea e subterrânea das plantas, assim como da terra dos vasos.

Os resultados mostraram elevada capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio pela centrosema correspondente a cerca de 204 quilogramas de nitrogênio por hectare.

1 - INTRODUÇÃO

Whyte e outros (14), em breve resumo histórico da família *Leguminosae*, contam que as populações lacustres da Suíça, entre os anos 5000 e 4000 A.C., cultivavam leguminosas. Referem-se ainda ao plantio de soja, entre 3000 e 2000 anos A.C., pelos chineses, e ao emprêgo de leguminosas na agricultura egípcia ao tempo das primeiras dinastias faraônicas.

Escritores gregos e romanos, como Virgílio, Varro e Columela, segundo Waksman (13), destacaram o valor das leguminosas como alimento e como enriquecedoras do solo.

Apesar de sua importância na manutenção e no melhoramento da fertilidade dos solos ser reconhecida desde os primórdios da agricultura, somente no século passado tal fenômeno foi explicado. Waksman (13) diz que as primeiras observações sobre a fixação do nitrogênio do ar pelas leguminosas foram feitas em 1813, por Davy.

(1) Recebido para publicação em 6 de agosto de 1963.

Segundo Waksman (13), Whyte e outros (14) foram Boussingault, Lawes e Gilbert, Hellriegel e Wilfart, Beijerinck e Prazmowski, que comprovaram essa fixação do nitrogênio e explicaram o fenômeno através da simbiose mantida entre a leguminosa hospedeira e bactérias fixadoras.

A quantidade de nitrogênio do ar que pode ser fixada é bastante variável, pois depende de fatores diversos, como condições do solo, especialmente aeração, drenagem e quantidade de cálcio, espécie de leguminosa, raça do rizóbio infectante etc.. (3, 4, 9, 11). A relação C/N tem grande importância como reguladora da atividade nodular. Segundo Thompson (12), a quantidade de nitrogênio fixada por simbiose depende da relação entre a quantidade de carboidratos na planta e a quantidade de nitrogênio disponível no solo. Quando a quantidade de hidratos de carbono na planta é elevada e o nitrogênio no solo é escasso, a bactéria poderá fixar quantidades desse elemento maiores do que se as reservas de hidratos de carbono forem pequenas ou se os teores de nitrogênio forem apreciáveis. Os fatores que, aumentando o ritmo da fotossíntese, aumentarem os teores de carboidratos, poderão incrementar a fixação do nitrogênio.

A literatura estrangeira (8, 10, 12) revela dados de quantidades desse elemento fixado simbioticamente, porém obtidos em trabalhos executados em condições ecológicas diversas. O Instituto Agrônomico (2, 5, 6, 7) tem estudado o assunto com leguminosas adaptadas ao Estado de São Paulo.

O presente trabalho visa determinar a capacidade fixadora do nitrogênio atmosférico pelas bactérias que vivem associadas às raízes da centrosema.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do ensaio, conduzido em vasos de Mitscherlich, utilizou-se a terra-roxa-misturada, proveniente da Estação Experimental "Theodoreto de Camargo", município de Campinas, e retirada à profundidade de 0-20 cm.

Analisada a terra, foram encontradas as seguintes características químicas:

pH internacional	6,10
N	0,20%
C	3,78%
PO ₄ ⁻³	0,04 e.mg/100 g de solo seco ao ar
Ca ⁺⁺	5,53 e.mg/100 g de solo seco ao ar
K ⁺	0,22 e.mg/100 g de solo seco ao ar
Mg ⁺⁺	1,61 e.mg/100 g de solo seco ao ar
H + Al ⁺⁺⁺	8,30 e.mg/100 g de solo seco ao ar

O ensaio constou dos 9 tratamentos abaixo relacionados, além de 4 tratamentos extras. As repetições foram em número de três.

- 1 - Testemunha
- 2 - NPK
- 3 - NPK + calagem
- 4 - NPK + inoculação
- 5 - NPK + calagem + inoculação
- 6 - PK
- 7 - PK + calagem
- 8 - PK + inoculação
- 9 - PK + calagem + inoculação

Os 4 tratamentos extras, cuja característica principal foi a ausência da planta, permitiram verificar a possível fixação de nitrogênio do ar por microrganismos não simbióticos. Tais tratamentos foram:

- 10 - 000
- 11 - 000 + calagem
- 12 - 000 + inoculação
- 13 - 000 + calagem + inoculação

Nos tratamentos em que se fez a correção da acidez do solo, calculou-se a quantidade de calcário, levando-se em conta o pH e H^+ + Al^{+++} trocável do solo (1). O objetivo foi elevar aquele índice a 6,5 e a saturação em bases do solo a 70%, empregando-se calcário dolomítico.

Os fertilizantes aplicados continham 2,0 g de N, 2,2 g de P_2O_5 e 3,0 g de K_2O , nas formas de sulfato de amônio, superfosfato simples e sulfato de potássio.

Com antecedência de 15 dias ao plantio, o calcário e os fertilizantes foram incorporados à terra dos vasos, e muito bem misturados para íntimo contato com as partículas do solo.

O plantio deu-se no dia 31 de outubro de 1961, usando-se dez sementes por vaso.

A inoculação das sementes, nos tratamentos correspondentes, foi realizada com inoculante específico para o grupo "cowpea" (*Rhizobium* sp) (2). As sementes receberam uma quantidade de solução inoculante, que foi medida. Quantidade igual à recebida por dez sementes foi usada para a inoculação da terra dos vasos que não receberam plantas (tratamentos 12 e 13).

(2) O inoculante foi fornecido pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Agrônomico do Estado.

A germinação teve início sete dias após o plantio. O desbaste foi realizado a 4 de dezembro, deixando-se três plantas por vaso. Durante o ensaio, foi mantida umidade favorável ao bom desenvolvimento das plantas, voltando-se diariamente o percolado.

As primeiras flôres da centrosema foram notadas a 6 de abril, e o corte se deu cinco dias depois. A colheita foi executada, cortando-se a parte aérea bem rente ao solo, dividindo a planta em duas porções: a aérea, constituída por hastes e fôlhas, e a subterrânea, constituída pelas raízes e seus nódulos. O material colhido foi imediatamente pesado.

As raízes, com auxílio de jatos de água, foram separadas dos blocos de terra e, depois, cuidadosamente lavadas e pesadas.

Por ocasião da retirada das raízes, foram coletadas amostras de terra de todos os vasos, para determinação dos teores de nitrogênio. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa a 60°C até peso constante.

Análises das partes vegetais foram efetuadas para determinação das concentrações de nitrogênio. O processo analítico foi o de Kjeldahl, para análises de terra e tecidos vegetais.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro 1 são apresentados os pesos de material das partes aérea e subterrânea, fresco e seco a 60°C, e ainda os respectivos teores de nitrogênio. Neste quadro, estão também expressas as porcentagens de nitrogênio encontradas na terra dos diversos vasos ao final do ensaio.

Pelos dados obtidos, observa-se não ter havido, pelo menos nas condições em que o trabalho foi conduzido, fixação de nitrogênio do ar por bactérias não simbióticas. Pela observação dos teores de nitrogênio encontrados nos tratamentos extras, ou seja, os que não receberam plantas, verifica-se serem iguais aos teores desse elemento, encontrados antes do início do ensaio. Tais dados comprovam não ter havido fixação desse elemento.

Os resultados das análises da terra dos vasos correspondentes aos tratamentos 6 (PK), 7 (PK + calagem), 8 (PK + inoculação) e 9 (PK + calagem + inoculação) mostram que todo o nitrogênio encontrado nas plantas foi fixado da atmosfera, pois o teor do solo, no final do experimento, foi igual ou levemente superior ao teor inicial.

Observa-se ainda grande influência das adubações (NPK ou PK) sobre a produção de massa verde.

QUADRO 1. — Produções de material fresco e seco a 60°C (médias de nove plantas). Porcentagens de nitrogênio total na parte aérea, nas raízes e no solo no final do ensaio. Quantidades de nitrogênio fixadas. Cálculo de massa total por hectare produzida pela centrosema

Tratamentos	Parte aérea				Raízes			N no solo no final do ensaio	Fixação de N		Massa total por hectare (calculada)
	Peso fresco	Peso seco 60°C	N do mat. seco 60°C	%	Peso fresco	Peso seco 60°C	%		Por planta	Por hectare (calculada)	
1. Testemunha	8,3	3,4	1,88	—	13,1	2,6	1,29	0,20	—	—	t
2. NPK	—	58,9	1,89	—	—	18,1	1,86	0,22	—	—	—
3. NPK + calagem	296,2	66,9	2,18	—	—	16,0	1,95	0,22	—	—	—
4. NPK + inoculação	—	70,7	1,67	—	—	19,4	1,80	0,21	—	—	—
5. NPK + cal. + inoc.	—	63,7	2,04	—	—	14,7	1,71	0,22	—	—	—
6. PK	191,1	52,7	2,19	—	104,0	12,9	1,83	0,21	1,39	167	35,4
7. PK + calagem	198,2	64,9	2,19	—	112,2	14,4	1,93	0,20	1,70	204	37,3
8. PK + inoculação	200,4	57,2	2,18	—	76,0	11,4	2,16	0,20	1,49	179	33,2
9. PK + cal. + inoc.	208,2	60,9	2,25	—	84,0	13,6	1,80	0,21	1,61	194	35,1
10. 000	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—	—
11. 000 + calagem	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—	—
12. 000 + inoculação	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—	—
13. 000 + cal. + inoc.	—	—	—	—	—	—	—	0,20	—	—	—

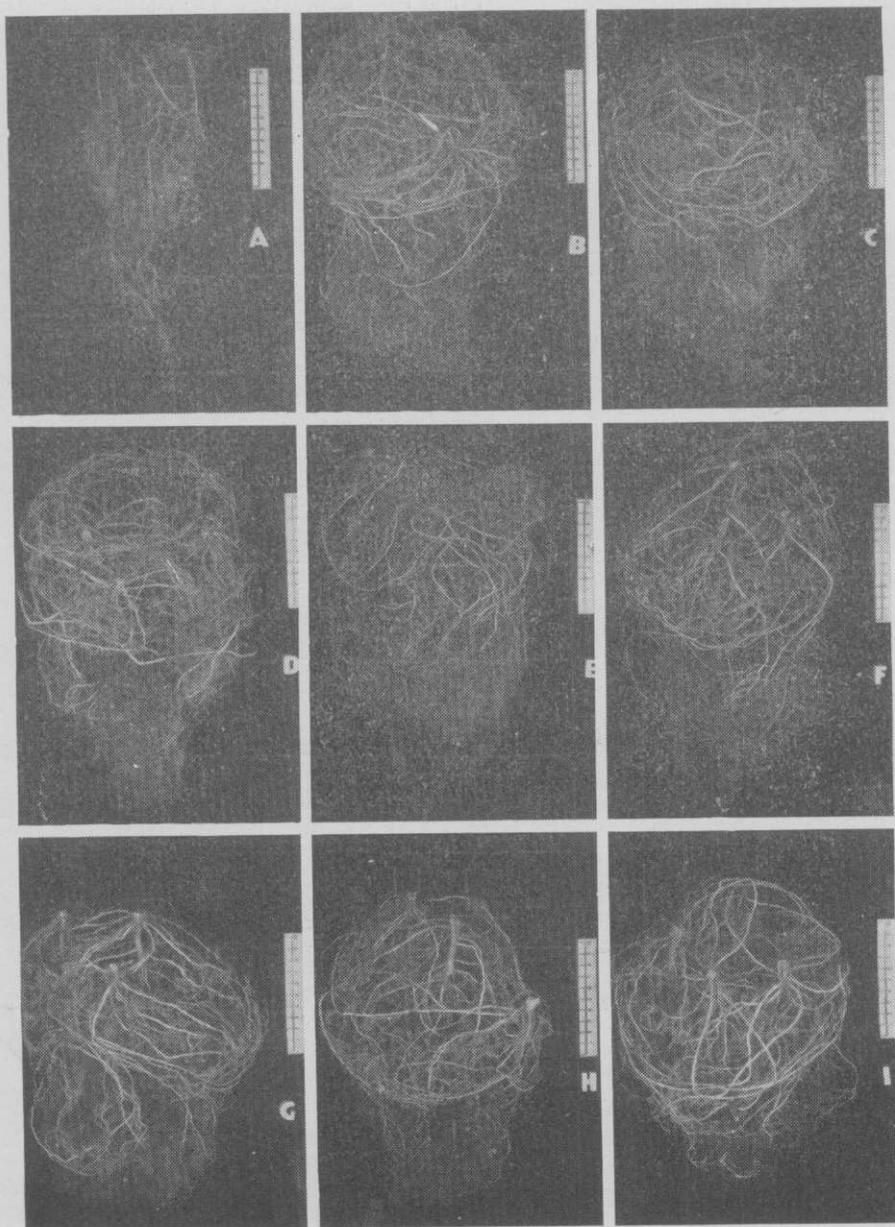


FIGURA 1. — Raízes de centrosema (*Centrosema pubescens* Benth), mostrando a nodulação: A — testemunha; B — NPK; C — NPK + calagem; D — NPK + inoculação; E — NPK + calagem e + inoculação; F — PK; G — PK + calagem; H — PK + inoculação; I — PK + calagem + inoculação.

Não houve influência da adubação nitrogenada sobre a concentração deste elemento nos tecidos, visto que as porcentagens de nitrogênio foram praticamente iguais, nos tratamentos que receberam ou não a fertilização nitrogenada, isto para a parte aérea e raízes.

O delineamento usado não permitiu isolar o efeito da calagem; pôde-se, porém, assinalar sua ação benéfica sobre a produção, nos tratamentos em que o nitrogênio foi omitido. Apesar de o solo, originalmente, oferecer um pH pouco ácido, mesmo assim o efeito do calcário se fez sentir, pois a inclusão desse tratamento proporcionou sempre aumentos na quantidade de massa verde das plantas que não receberam adubação nitrogenada.

As quantidades médias de nitrogênio fixadas por planta foram determinadas para alguns tratamentos. Não se considerou o nitrogênio que pudesse ter sido excretado da planta para o solo, devido à impossibilidade desta determinação nas condições do ensaio.

Como todo o nitrogênio encontrado nas plantas desses tratamentos provém da fixação simbiótica, ao se efetuar o cálculo teórico da quantidade a ser fixada em um hectare, levou-se em conta não somente o volume de massa verde produzido, mas, também, a quantidade de raízes que permaneceriam nesta área.

Os dados contantes do quadro I, relativos à produção total de massa por hectare e à quantidade de nitrogênio fixada, foram calculados, tomando-se os valores médios respectivos, determinados por planta, e multiplicados por 120.000. Este fator corresponde ao número de plantas da área considerada.

4 – CONCLUSÕES

As conclusões que os dados permitem tirar são as que seguem:

1 – Nas condições em que se trabalhou, não foi constatada fixação de nitrogênio atmosférico por outros microrganismos que não as bactérias simbióticas.

2 – O fertilizante nitrogenado teve ação favorável na produção de massa verde, quando o solo não recebeu calcário. Na presença de calcário, essa ação não se fez sentir. Em qualquer dos casos, porém, não houve diferenças nas porcentagens de nitrogênio nas partes vegetais.

3 – O nitrogênio encontrado nas plantas dos tratamentos que não receberam adubação com esse elemento, foi totalmente fixado por sim-

biose, visto que seus teores, na terra dos vasos, foram sempre iguais ou ligeiramente superiores ao teor inicial. Isso mostra ser a *centrosema* uma leguminosa de alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, e, portanto, promissora como adubo verde.

4 — A quantidade total de nitrogênio fixada, simbioticamente, por uma planta, no melhor tratamento (PK + calcário) foi de 1700 gramas. Essa quantidade corresponderia a uma fixação de cerca de 204 kg de nitrogênio por hectare.

LITERATURA CITADA

1. CATANI, R. A., GALLO, J. ROMANO & GARGANTINI, H. Amostragem de solo, métodos de análise, interpretação e indicações gerais para fins de fertilidade. Campinas, Instituto Agrônomico, 1955 (Boletim n.º 69).
2. ———, GARGANTINI, H. & GALLO, J. ROMANO. Fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem associadas com as leguminosas crotalária e mucuna. *Bragantia* 14:[1]-8. 1954.
3. CLARK, F. E. Soil microorganisms and plant roots. Norman, A. G. ed. *Advances in Agronomy*. Vol. 1. 1949.
4. ENSMINGER, L. E. & PEARSON, R. W. Soil nitrogen. Norman, A. G. ed. *Advances in Agronomy*. Vol. 2. 1950.
5. GARGANTINI, H. Fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem associadas às raízes do guandu. (Não publicado).
6. ——— & CATANI, R. A. Fixação do nitrogênio do ar atmosférico pelas bactérias que vivem associadas às raízes da soja. *Bragantia* 17:[195]-204. 1958.
7. ——— & WUTKE, A. C. P. Fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem associadas às raízes do feijão-de-porco e feijão-baiano. *Bragantia* 19:[639]-652. 1960.
8. LYON, L. T., BUCKMAN, H. O. & CADY, N. The nature and properties of soils. 5.ª edição. The MacMillan Company, 1952. 591 p.
9. NORMAN, A. G. Recent advances in soil microbiology, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 11:[9]-15. 1946.
10. RUSSEL, E. J. Soil conditions and plant growth. 8.ª ed. London, Longmans, Green & Co., 1950.
11. SHIELDS, L. N. Nitrogen sources of seed plants and environmental influences affecting the nitrogen supply. *Bot. Rev.* 19:[321]-376. 1953.
12. THOMPSON, L. M. Soils and soil fertility. New York, Mac Graw-Hill Book Co. Inc., 1952.
13. WAKSMAN, S. A. Soil microbiology. New York, Wiley and Sons, 1952. 356 p.
14. WHYTE, R. O., NILSON, LEISSNER G., TRUMBLE, H. C. Las leguminosas en la agricultura. Roma, FAO, 1955.

FIXATION OF THE ATMOSPHERIC NITROGEN BY BACTERIA WHICH LIVE SYMBIOTICALLY ON *CENTROSEMA*

SUMMARY

Following a series of research work with the purpose of verifying the amount of atmospheric nitrogen fixed by symbiotic bacteria, the authors report in this paper the results on their research with the leguminous plant *Centrosema pubescens* Benth.

This experiment was conducted in Mitscherlich pots containing terra-roxa-misturada obtained from a 20 cm deep layer of soil taken from the Central Experiment Station "Theodoreto de Camargo", in Campinas.

The plants were cut in the blooming period, as this is the proper season for turning over green manure crops. The aerial portion of the plants was weighed so as to determine the total production of green matter and then it was dried together with the roots at 60°C.

Thus, nitrogen of the total plant was determined and the same analysis was done at the end of the experiment for the soil removed from the pots.

According to the results of this experiment, it was found that 204 kilograms of nitrogen per hectare were fixed, showing therefore that centrosema has a high capacity of symbiotic nitrogen fixation.

ferenças nas porcentagens de nitrogênio nas partes vegetais.

3 — O nitrogênio encontrado nas plantas dos tratamentos que não receberam adubação com esse elemento, foi totalmente fixado por sim-