

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO

Elke

Microbiologia do Solo

Coordenadoras:

Elke J.B.N. Cardoso

Siu M. Tsai

Maria Cristina P. Neves

Campinas (SP)

1992

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO

CGC: 42.137.836/001-82

Conselho Diretor 91/93

PRESIDENTE: Egon Klamt

1º VICE-PRESIDENTE: Luiz Carlos Valladares Borges

2º VICE-PRESIDENTE: Antonio Carlos Moniz

SECRETÁRIO: Otávio Antonio de Camargo

TESOUREIRO: Ronaldo S. Berton

CONSELHEIROS: Sérvulo Batista de Rezende, Heitor Cantarella, Ary Delcio Cavedon, Marcos José Vieira, Caio Vidor e Dejair Lopes de Almeida.

Responsável pelas publicações da SBCS: Antonio C. Moniz

C179m

Cardoso, Elke Jurandy Bran Nogueira, coord.
Microbiologia do solo, coordenado por E.J.B.N. Cardoso, S.M.Tsai
e M.C.P. Neves. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo,
1992.

360p.

I. Solo – Microbiologia. I. Tsai, Siu Mui, coord. II. Neves, Maria
Cristina Prata, coord. III. Título.

CDD 631.46

COLABORAÇÃO NA IMPRESSÃO

Ministério da Agricultura
Manah S.A.
Fundação Cargill

APOIO FAPESP

Na composição desta obra, bem como de publicações de outras sociedades científicas, com sede no Instituto Agrônomo, foram utilizados equipamentos de editoração eletrônica adquiridos com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

SUMÁRIO

Página

| | | |
|-------------|---|-----|
| CAPÍTULO 1 | Os componentes da comunidade microbiana do solo. <i>Edgar M. Brandão</i> | 1 |
| CAPÍTULO 2 | Como os microrganismos do solo obtêm energia e nutrientes. <i>M. Cristina P. Neves</i> | 17 |
| CAPÍTULO 3 | Ecologia microbiana do solo. <i>Elke J.B.N. Cardoso</i> | 33 |
| CAPÍTULO 4 | A rizosfera. <i>Elke J.B.N. Cardoso & Sueli S. Freitas</i> | 41 |
| CAPÍTULO 5 | Efeito de fatores do solo. <i>Siu Mui Tsai, Amalia V.L. Baraibar & Vera L.M. Romani</i> | 59 |
| CAPÍTULO 6 | O ciclo do carbono no solo. <i>Carlos C. Cerri, Francis Andreaux & Brigitte P. Eduardo</i> | 73 |
| CAPÍTULO 7 | Poluição orgânica e seu controle. <i>Márcio R. Lambais</i> | 91 |
| CAPÍTULO 8 | O ciclo do nitrogênio. <i>Reynaldo L. Victoria, Marisa C. Piccolo & Álvaro A. T. Vargas</i> | 105 |
| CAPÍTULO 9 | Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. <i>João R.J. Freire</i> | 121 |
| CAPÍTULO 10 | Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. <i>Maria Cristina P. Neves & Norma G. Rumjaneck</i> | 141 |
| CAPÍTULO 11 | Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. <i>Celso G. Auer & Romildo da Silva</i> | 157 |
| CAPÍTULO 12 | Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. <i>Johanna Döbereiner</i> | 173 |

| | | |
|---|--|-----|
| CAPÍTULO 13 | | |
| Fixação biológica de nitrogênio por microrganismos assimbióticos. <i>Alaides P. Ruschel & Marisia C.F. Pontes</i> | | 181 |
| CAPÍTULO 14 | | |
| Associações simbióticas com cianobactérias. <i>Marli de F. Fiore</i> | | 201 |
| CAPÍTULO 15 | | |
| Fixação do N ₂ em leguminosas cultivadas em solos de cerrados. <i>J.R.R. Peres, A. R. Suhet & M.A.T. Vargas</i> | | 213 |
| CAPÍTULO 16 | | |
| Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. <i>Avilio A. Franco & Maria C. P. Neves</i> | | 219 |
| CAPÍTULO 17 | | |
| Transformações microbianas do fósforo. <i>Siu M. Tsai & Raffaella Rossetto</i> | | 231 |
| CAPÍTULO 18 | | |
| Solubilização microbiana de fosfatos. <i>Augusto F. Eira</i> | | 243 |
| CAPÍTULO 19 | | |
| Micorrizas. <i>Adriana P.D. Silveira</i> | | 257 |
| CAPÍTULO 20 | | |
| Aplicações práticas de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA). <i>Elke J.B.N. Cardoso & Márcio R. Lambais</i> | | 283 |
| CAPÍTULO 21 | | |
| Ectomicorrizas. <i>Margarida M. Bellei & Eulália M.S. Carvalho</i> | | 297 |
| CAPÍTULO 22 | | |
| O enxofre e suas transformações microbianas. <i>Oswaldo Garcia Jr.</i> | | 319 |
| CAPÍTULO 23 | | |
| Transformações microbianas de outros elementos (Potássio, micronutrientes e metais pesados). <i>Mariangela Hungria & Segundo Urquiaga</i> | | 329 |
| CAPÍTULO 24 | | |
| Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. <i>M.R. Musumeci</i> | | 341 |

APRESENTAÇÃO

Já há muitos anos os pesquisadores, estudiosos e principalmente professores e alunos brasileiros, na área de microbiologia do solo, vêm sentindo falta de um texto em português que seja atualizado e que traga alguma contribuição de dados de pesquisa obtidos em condições brasileiras.

Todo o ensino era baseado em livros estrangeiros com apresentação de resultados obtidos essencialmente em condições de clima temperado, ou seja, europeus e americanos. Além dessa deficiência existe a consideração de que nem todos os estudantes brasileiros conseguem ler textos escritos em outras línguas com a mesma facilidade com que lêem textos científicos em português.

Em vista de toda essa problemática, a Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, por intermédio das coordenadoras deste livro, levou à frente a idéia de se produzir um livro nacional de microbiologia do solo, com a contribuição do maior número possível de cientistas e professores do nosso país. E é ao esforço conjunto de todo esse grupo de pesquisadores que se deve hoje a possibilidade de apresentarmos esse livro ao público. Acreditamos que com ele esteja sendo preenchida uma lacuna da ciência em nosso país. Embora se tenha procurado produzir um livro puramente didático e de pós-graduação, é possível que os resultados, gráficos e ilustrações, bem como alguma problemática nele debatida, venham a inspirar os próprios pesquisadores a encontrar soluções novas para problemas dessa área.

O conteúdo deste livro procura refletir a ênfase que vem sendo colocada pelos nossos pesquisadores nos diferentes temas que compõem a microbiologia do solo: primeiramente uma apresentação sucinta dos grupos de microrganismos a serem estudados, de sua fisiologia e ecologia. Seguem-se, então, os ciclos do carbono, do nitrogênio (com maior detalhamento da fixação biológica do nitrogênio), do fósforo, do enxofre e dos outros nutrientes vegetais, além da microbiologia dos defensivos agrícolas. São ainda incluídos os aspectos mais importantes das micorrizas. Sempre que possível, procurou-se um especialista na área para escrever determinado capítulo.

Queremos expressar os nossos sinceros agradecimentos a todos os colegas que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização desta obra. Ainda, o nosso profundo reconhecimento pelo esforço da SBSCS, na pessoa de A. C. MONIZ, Editor-responsável da Revista Brasileira de Ciência do Solo, pelo apoio prestado para a sua finalização.

Campinas, 01/01/1992

E.J.B.N. Cardoso S.M. Tsai M.C.P. Neves

OS COMPONENTES DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

Edgar M. Brandão⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

No universo dos microrganismos são classificados quatro grupos distintos: bactérias, fungos, algas e protozoários. Os vírus, também encontrados no solo, não são considerados neste esquema que se baseia na organização celular.

Inicialmente, algas, fungos e bactérias foram classificados como pertencentes ao Reino Vegetal e os protozoários, ao Reino Animal. Em 1866, Ernest H. Haeckel, na Alemanha, propôs que os microrganismos deveriam ser classificados em um terceiro reino, o qual foi denominado Protista. Essa classificação toma como base a organização simplificada e a ausência de tecido verdadeiro nestes organismos. Entretanto, a proposição de Haeckel foi muito contestada e, apenas a partir de 1950, com a utilização da microscopia eletrônica e os avanços na bioquímica e biologia molecular, passou-se a aceitar os Protistas como um terceiro reino entre os organismos vivos.

Uma vez pertencentes ao Reino Protista, os microrganismos foram também divididos em dois tipos: procarióticos e eucarióticos. As bactérias, grupo onde atualmente estão incluídas as cianobactérias (algas verde-azuladas) e actinomicetos, constituem os organismos procarióticos, devido a sua organização simplificada, podendo também serem denominados de protistas inferiores. Fungos, algas e protozoários apresentam uma organização celular mais complexa, e constituem, por sua vez, os organismos eucarióticos ou protistas superiores.

⁽¹⁾ Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes. ESALQ/USP. Caixa Postal 9, CEP 13400, Piracicaba, SP.

Em 1969, Whittaker (16) propôs um novo sistema de classificação baseado em três diferentes níveis de organização celular e nas diferenças evolucionárias em relação aos principais modos de nutrição, a saber: fotossíntese, absorção e ingestão. Os organismos procarióticos formam o reino Monera que é constituído pelas bactérias e cianobactérias, cuja principal característica é não apresentarem nutrição por ingestão. Os organismos unicelulares eucarióticos formam o reino Protista, constituído pelas algas e protozoários, onde encontramos o sistema nutritivo fotossintético para as algas e o de ingestão para os protozoários. Os organismos eucarióticos multicelulares formam os reinos Plantae, Animalia e Fungi, este último sendo constituído pelos fungos unicelulares e filamentosos (Figura 1).

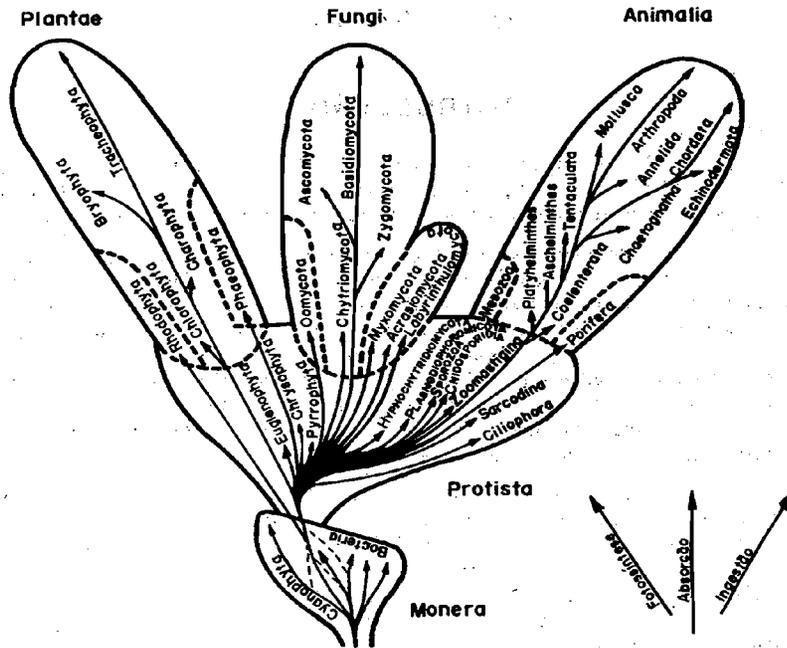


Figura 1. Sistema de classificação dos cinco reinos de Whittaker (16).

A CÉLULA PROCARIÓTICA

A denominação procarioto é derivada do grego pro precursor, primitivo e karyon (caroço, semente, núcleo), identificando, desta forma, os organismos que apresentam núcleo primitivo (Figura 2).

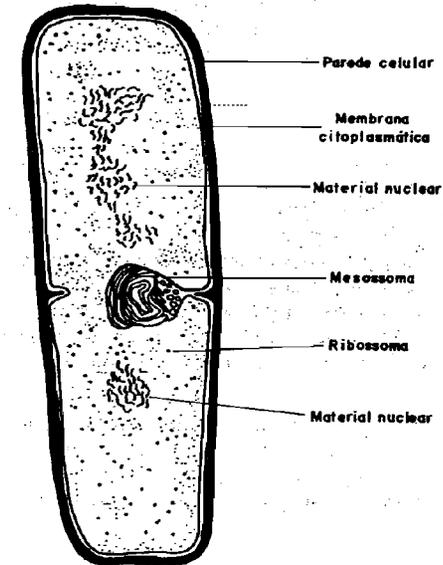


Figura 2. Desenho esquemático de célula procariótica representando uma bactéria em divisão celular. (11)

A célula procariótica (4, 9, 13) é o tipo celular mais simples que se conhece. Seu material genético, o cromossomo, que consiste de uma molécula de fita dupla de DNA, está em contato direto com o citoplasma formando um núcleo difuso, não apresentando membrana envoltória. Essas células se reproduzem de forma assexuada por fissão binária, originando, deste modo, duas células filhas idênticas, as quais possuem uma cópia do material genético (DNA) da célula parental.

O envoltório celular das células procarióticas é formado pela membrana citoplasmática e pela parede celular. A membrana citoplasmática é

uma estrutura altamente especializada, constituída de lipídeos e proteínas, e que atua como uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente externo. Apresenta como propriedade principal a semipermeabilidade, atuando de forma seletiva sobre o movimento de pequenas moléculas e íons para dentro e fora da célula.

Algumas proteínas presentes na membrana citoplasmática são responsáveis pelo transporte de elétrons e atuam na fosforilação oxidativa, convertendo a energia oxidativa em energia química do ATP. A membrana plasmática das bactérias fotossintetizantes apresenta clorofila e outros pigmentos captadores de luz.

A parede celular, por sua vez, localiza-se externamente à membrana plasmática, protegendo a célula de choques osmótico e mecânico além de conferir rigidez e manter a forma celular. Existem diferenças fundamentais na parede celular das bactérias e, com a utilização da técnica de coloração de Gram podemos distinguir dois principais grupos, do ponto de vista dessas diferenças: gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa e apresentam baixos teores de lipídeos, bem como grandes quantidades de peptídeoglicano, um composto polimérico responsável pela estrutura rígida da parede. As bactérias gram-negativas, por sua vez, apresentam parede celular mais delgada e menores quantidades de peptídeoglicano.

No citoplasma das células procarióticas está presente um grande número de elementos granulares denominados ribossomos. Estes são organelas complexas constituídas de moléculas de proteínas e ácido nucléico (RNA), formando partículas esféricas responsáveis pela síntese de proteínas.

A CÉLULA EUCARIÓTICA

O prefixo grego eu significa "verdadeiro, típico" sendo que, a palavra eucariótico (4, 9, 13) indica a existência de um núcleo bem formado, ou seja, a maior parte de seu DNA está limitada por um envelope nuclear ou carioteca, constituído por um par de membranas que formam um compartimento denominado núcleo celular (Figura 3). As duas membranas formadoras do envelope nuclear se fundem em alguns locais, formando aberturas que são denominadas poros nucleares, permitindo, dessa forma, a passagem de substâncias entre o núcleo e o citoplasma. Podemos observar, no interior do núcleo, o nucléolo, região rica em ácido ribonucleico (RNA), que é o sítio responsável pela produção dos principais componentes dos ribossomos. No núcleo também estão presentes os cromossomos, cujo número e morfologia são característicos para cada espécie de organismo.

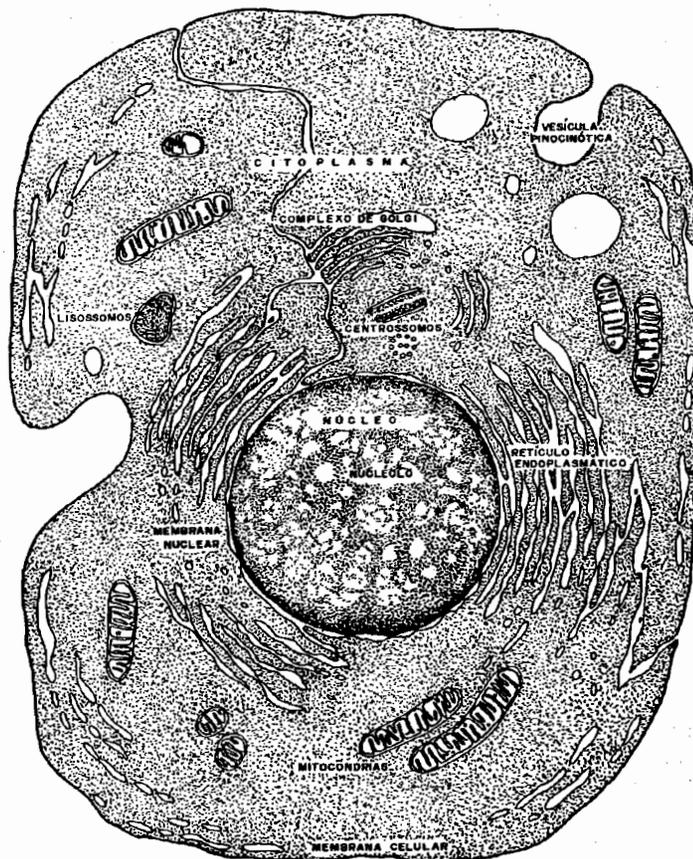


Figura 3. Desenho esquemático de uma célula eucariótica (12).

O citoplasma das células eucarióticas apresenta-se altamente organizado em pequenos compartimentos limitados por membranas e denominados organelas citoplasmáticas, tais como: mitocôndria, retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, cada qual possuindo uma função específica no metabolismo celular.

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção da maior parte da energia utilizável pela célula. Possuem dois sistemas de membrana, sendo uma externa lisa e uma interna, a qual possui dobramentos chamados cristas. Internamente a mitocôndria é preenchida pela matriz que contém uma mistura de enzimas diferentes entre as quais estão as responsáveis pela oxidação do piruvato e ácidos graxos e as enzimas envolvidas no ciclo de Krebs. As mitocôndrias também possuem pequenas quantidades de DNA, RNA e ribossomos.

O retículo endoplasmático é constituído por um complexo de membranas que formam canais denominados cisternas e são responsáveis pelo transporte de vários produtos celulares para o exterior da célula, além do armazenamento destes. O retículo endoplasmático é dividido em duas porções funcionalmente distintas e estruturalmente intercomunicantes: o retículo endoplasmático rugoso, que apresenta sua membrana externa recoberta por ribossomos, e o retículo endoplasmático liso, que não apresenta esta característica e cuja principal função é a biossíntese de lipídeos. Os ribossomos, por sua vez, são responsáveis pela biossíntese de proteínas.

O aparelho de Golgi é constituído por um conjunto de vesículas achatadas, cada uma envolvida por uma única membrana. Ocorrem também vesículas esféricas menores, próximas às extremidades das vesículas maiores, devido a um estrangulamento das mesmas. Sua principal função é "armazenar" os produtos celulares do retículo endoplasmático em vesículas secretoras, liberando-os ao exterior da célula, processo esse denominado exocitose.

BACTÉRIAS

As bactérias do solo formam o grupo de microrganismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 a 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo e manejo do solo (1).

Este grupo apresenta uma elevada taxa de crescimento e alta capacidade de decomposição dos diferentes substratos contidos no solo, exercendo um importante papel na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem dos elementos. No solo, também estão presentes bactérias fotossintetizantes, responsáveis pela produção de matéria orgânica através da utilização de energia luminosa. As bactérias diazotróficas apresentam a capacidade de fixar o nitrogênio molecular (N_2) presente na atmosfera. Com um número de espécies relativamente pequeno, porém apresentando uma grande importância agrônoma, encontramos as bactérias quimiolitotróficas capazes não só de oxidar compostos minerais de nitrogênio e enxofre como também de fixar CO_2 , obtendo dessa forma, energia e carbono necessários para seu desenvolvimento (ver Capítulo 2).

As bactérias apresentam tamanho reduzido (cerca de $0,5-1,0 \mu m$ x $1,0-2,0 \mu m$) e as células individuais podem apresentar-se, basicamente, de três formas: células esféricas ou elípticas (cocos), cilíndricas ou em bastonetes e espiraladas ou helicoidais. Os cocos podem formar agregados multicelulares apresentando diferentes tipos de arranjos que são determinados pelos planos de divisão sucessivos, os quais ocorrem devido ao processo de reprodução das bactérias denominado fissão binária (Figura 4).

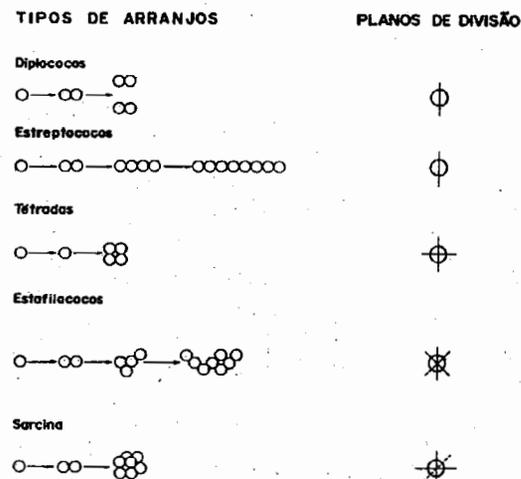


Figura 4. Tipos de arranjos e planos de divisão dos cocos bacterianos.

As células bastonetiformes ou espiraladas apresentam divisão celular unicamente no eixo perpendicular ao maior comprimento, podendo apenas formar cadeias de células. A fissão binária é o método mais comum de divisão celular porém algumas células podem se reproduzir por brotamento. Os actinomicetos, por sua vez, podem apresentar três tipos de reprodução: a) por fragmentação do micélio, b) por produção de conídios isolados ou formando cadeias e c) por fissão do ápice das hifas.

Algumas bactérias não apresentam motilidade, enquanto que outras são móveis devido aos flagelos que podem estar presentes em número de um ou mais, na extremidade da célula (polares) ou distribuídos ao redor da mesma (peritríqueos).

Bactérias também podem apresentar pilis ou fimbrias em torno da parede celular, responsáveis pela capacidade de adesão em certos substratos ou, ainda, pela transferência de material genético durante o processo de conjugação.

As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, entre outras, possuem a capacidade de formar endosporos, os quais são esporos de resistência que aparecem em culturas mais velhas, às vezes quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis para o seu desenvolvimento. Os endosporos formados não apresentam função reprodutiva, mas apenas de sobrevivência, e possuem a característica de serem altamente refringentes, devido ao seu baixo teor de água, com resistência ao dessecação e ao calor. Na formação dos endosporos ocorre uma redução no metabolismo celular.

A utilização exclusiva das diferenças morfológicas para a classificação das bactérias não é suficiente (8). O uso de técnicas de coloração diferenciais e a realização de uma série de testes bioquímicos, aliados atualmente à utilização de técnicas sorológicas, homologia na composição das bases de DNA, bem como da taxonomia numérica, fornecem dados suficientes para a classificação em gênero e espécie conforme descrito no "Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey" (7). Os testes bioquímicos consistem na avaliação da capacidade de utilização de vários carboidratos e outros compostos orgânicos, bem como dos produtos da decomposição, tais como produção de gases e desenvolvimento de acidez metabólica. O Manual de Bergey não apresenta uma hierarquia bacteriana, uma vez que, na maioria dos casos, não existem informações suficientes que reflitam relações evolutivas.

Os principais gêneros de bactérias que apresentam funções importantes no solo serão apresentados neste livro à medida que forem sendo discutidos os diferentes aspectos da Microbiologia do Solo.

INFLUÊNCIA AMBIENTAL

Em um ambiente tão complexo quanto o solo onde fatores químicos e físicos interagem continuamente, influenciando as condições de umidade, temperatura, reação do solo, aeração, etc., podemos perceber que a comunidade bacteriana presente é regida fortemente por estas, afetando sobremaneira a composição microbiana tanto qualitativa quanto quantitativamente (1, 5).

Por ser o maior componente protoplasmático de um organismo vivo, a água deve estar presente em quantidades adequadas para assegurar um bom desenvolvimento. O teor de umidade de um solo é responsável pelas modificações das trocas gasosas e, ao mesmo tempo, pelo transporte dos nutrientes utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento. Para as bactérias aeró-

bias, a umidade ideal encontra-se na faixa de 50-70% da capacidade de retenção de água do solo. Em solos hidromórficos, ou seja, solos que são submetidos a condições de encharcamento temporário ou permanente, ocorrem modificações químicas e físicas que atuam profundamente no equilíbrio microbiológico.

A temperatura do solo, por sua vez, depende de fatores como cobertura vegetal, tipo de solo, umidade, etc., tratando-se de uma relação entre a energia calorífica absorvida e perdida pelo solo. Existem temperaturas máximas e mínimas que determinam as atividades bioquímicas e as taxas de crescimento dos microrganismos. Ocorrem também variações diárias, sazonais e de acordo com a profundidade, sendo que, nos horizontes superficiais, ou seja, nas áreas onde ocorre maior atividade biológica, essas variações são mais intensas.

Outro fator importante são os valores extremos de pH, considerados desfavoráveis para o crescimento dos microrganismos, não apenas pelo efeito direto da elevada concentração de íons H^+ ou OH^- , mas também pela influência indireta na disponibilidade de nutrientes e na penetração, no interior das células microbianas, de compostos tóxicos presentes no meio.

FUNGOS

Os fungos (3, 11, 15) são classificados como protistas superiores pois são constituídos por células eucarióticas. Podem ser unicelulares como as leveduras, ou pluricelulares, ditos fungos filamentosos. Os fungos possuem formações denominadas hifas, que são filamentos tubulares ramificados com cerca de 3-10 μm de diâmetro. O conjunto de hifas ramificadas que dá um aspecto de algodão ao organismo é denominado micélio. As hifas apresentam parede celular rígida, constituída principalmente por quitina, podendo também apresentar celulose em sua constituição. As hifas podem ou não apresentar septos resultantes de invaginações da parede celular que, porém, não individualizam a célula, permitindo que o citoplasma e os núcleos possam migrar de um compartimento para o outro, sendo por isso denominadas cenocíticas.

Todos os fungos são aclorofilados e, portanto, quimiorganotróficos, obtendo o carbono para a síntese celular de matéria orgânica pré-formada. Grande parte dos fungos produz esporos, tanto de forma assexual, como de forma sexual.

Os fungos são encontrados no solo com comunidades variando de 10^4 a 10^6 organismos por grama de solo (1). São predominantes em solos ácidos, onde sofrem menor competição, pois as bactérias e actinomicetos são favorecidos por valores de pH na região alcalina e neutra. Os fungos podem ser encontrados em solos com pH de 3,0 a 9,0, porém o valor ótimo é variável com a espécie.

A umidade do solo ideal para o desenvolvimento desses organismos está localizada entre 60-70% da capacidade de retenção de água de um solo.

Em geral, os fungos são aeróbios, porém apresentam resistência a altas pressões de CO₂, podendo se desenvolver em regiões mais profundas do solo. Quanto à temperatura, podem ser encontrados em uma ampla faixa, entretanto no solo predominam espécies mesófilas.

As principais funções dos fungos no solo são apresentadas nos capítulos referentes à Ecologia Microbiana e Micorrizas.(6)

A classificação taxonômica (15) dos fungos toma por base as características dos esporos sexuais ou assexuais formados durante o ciclo vital. No solo, podemos encontrar os fungos mais simples (mucilaginosos) que apresentam suas estruturas somáticas desprovidas de parede celular e são pertencentes à divisão Mixomycota. Os fungos verdadeiros são aqueles que apresentam parede celular em todas as suas estruturas e pertencem à divisão Eumycota (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação taxonômica dos fungos pertencentes à divisão Eumycota

| Sub-divisão | Classe | Característica do micélio e tipo de esporos |
|--------------------------------|---------------------------------|---|
| Mastigomycotina | Chytridiomycetes Oomycetes | não septado, diplóide oósporo |
| Zigomycotina | Zygomycetes | não septado, haplóide esporangiósporo |
| Ascomycotina | Ascomycetes | septado, haplóide ascósporos |
| Basidiomycotina | Hymenomycetes Gasteromycetes | septado, dicariótico (par de núcleos haplóides) basidiósporos |
| Deuteromycotina ⁽¹⁾ | Deuteromycetes | septado, haplóide esporos assexuais (conídios) |

⁽¹⁾ Também chamado Fungi Imperfecti.

ALGAS

As algas ocorrem em maior número na superfície do solo (0-5 cm) podendo também ser encontradas nos horizontes mais profundos. Normalmente estão na faixa de 10³ a 10⁴ organismos por grama de solo podendo atingir, em condições de alta umidade ou em áreas de deserto, cerca de 10⁸ organismos por grama de solo.

O estudo taxonômico das algas do solo apresenta um agrupamento desses organismos em quatro divisões: Chlorophycophyta (algas verdes), Chrysophycophyta (algas diatômicas), Euglenophycophyta (euglenóides), e Rhodophycophyta (algas vermelhas), sendo que no solo, as algas verdes e diatômicas

são encontradas em maior número. Alguns autores consideram mais uma divisão denominada Chyanochloronta (algas verde-azuladas), porém estas atualmente estão sendo reconhecidas como bactérias verde-azuladas ou Cianobactérias (10).

A maioria das algas são fotolitotróficas e utilizam a radiação solar como fonte de energia produzindo seus compostos orgânicos a partir de precursores inorgânicos. Algumas algas, no entanto, podem ser denominadas fotolitotróficas facultativas, ou seja, possuem a capacidade de utilizar açúcares ou ácidos orgânicos na ausência de luz, comportando-se como organismos quimiorganotróficos (10, 13).

As algas contribuem para a formação e para a integridade dos solos. São os primeiros organismos colonizadores dos substratos expostos recentemente à biosfera, incluindo solos formados por erupções vulcânicas e áreas de mineração, onde a maioria dos microrganismos não consegue se desenvolver. As algas promovem a intemperização de minerais silicatados, através de uma maior retenção de água e produção de ácido carbônico.

As primeiras contribuições decorrentes da presença de uma população de algas em um solo são: incorporação de carbono (produção de matéria orgânica), através da fotossíntese e estabilização dos agregados do solo.

PROTOZOÁRIOS

Os protozoários são protistas superiores, unicelulares, cujo tamanho pode variar de alguns micrômetros até um ou mais centímetros. Não apresentam parede celular e são desprovidos de clorofila, porém algumas espécies possuem cromatóforos que são corpúsculos portadores de pigmentos responsáveis pela fotossíntese. Existem protozoários de vida livre e aqueles que apresentam associações com outros organismos, os quais são denominados simbioses. O ciclo de vida de um protozoário é constituído por uma fase ativa e uma fase de dormência ou estágio de cisto. O encistamento ocorre quando as condições ambientais são desfavoráveis para a sua sobrevivência, podendo persistir por muitos anos.

Os protozoários apresentam reprodução assexual através de fissão binária no sentido longitudinal ou transversal, porém alguns podem se reproduzir sexualmente, pela união de dois gametas.

De acordo com a forma de locomoção, os protozoários do solo podem ser divididos em: a) Mastigophora - através de um ou mais flagelos, b) Sarcodina (podem ser denominados de rizópodos ou amebas) - através de organelas temporárias denominadas pseudópodos, c) Ciliata - através de cílios curtos ao redor da célula.

Os flagelados formam o grupo de protozoários encontrados no solo em maior número, possuem tamanho reduzido com comprimento variando entre

5 a 20 μm , e podem possuir de um a quatro flagelos, sendo que, ocasionalmente, algumas espécies apresentam mais de quatro flagelos.

Entre os protozoários, podemos encontrar três diferentes mecanismos para obtenção de nutrientes. Algumas espécies são fotolitotróficas, pois são capazes de sintetizar compostos orgânicos através da fotossíntese. Outras são quimiorganotróficas, pois requerem substâncias orgânicas pré-formadas presentes no ambiente. Os quimiorganotróficos podem ser saprófitas, obtendo seus nutrientes por absorção, ou holozóicos, através da ingestão de microrganismos ou partículas de alimentos (fagocitose). O alimento é digerido no vacúolo e a fração não digerida é devolvida ao ambiente.

Acredita-se que os protozoários representam um fator importante no controle do tamanho das populações bacterianas no solo. Existe, porém, uma certa preferência por bactérias gram-negativas, principalmente as que não possuam pigmentação própria. Bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Pseudomonas* são as mais predadas.

As populações de protozoários no solo podem variar entre 10^4 a 10^5 organismos por grama de solo. O método mais utilizado para este levantamento é o da diluição à extinção e contagem pelo número mais provável (NMP). Para a enumeração e isolamento de protozoários do solo, é muito utilizada a técnica de enriquecimento em meio líquido ou sólido de extrato de solo inoculado com bactérias (1).

As populações de protozoários, tanto saprófitos, como predadores, são maiores na superfície do solo, uma vez que é nessa faixa que encontram maiores teores de matéria orgânica, condição necessária para que ocorram maiores populações bacterianas. Teores elevados de umidade favorecem os protozoários flagelados e ciliados. Os protozoários são aeróbios e podem ser encontrados em faixas de pH que variam de 3,5 a 9,0.

VÍRUS

Os vírus são partículas infecciosas submicroscópicas, constituídas de uma molécula de ácido nucléico (DNA ou RNA), circundado por uma capa protéica denominada capsídeo. O capsídeo apresenta subunidades protéicas, os capsômeros, os quais são responsáveis pela especificidade viral.

Os vírus requerem a presença de uma célula hospedeira ativa metabolicamente, para que ocorra a sua multiplicação através das informações genéticas fornecidas pelo seu ácido nucléico.

Pelo fato de existir uma especificidade na relação vírus-hospedeiro, o solo participa como um disseminador de viroses de plantas, uma vez que os

fitovírus podem ser adsorvidos pelas partículas coloidais do solo, ficando assim protegidos da degradação enzimática e mantendo sua infectividade (2). A presença no solo de nematóides e fungos também auxilia na transmissão dos fitovírus (14).

Outros tipos de vírus presentes no solo são denominados bacteriófagos, os quais são vírus que utilizam células bacterianas como hospedeiras. No solo, já foram encontrados bacteriófagos específicos de *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, etc.

Para a multiplicação de um bacteriófago, é necessário que ocorra primeiramente o processo de adsorção, onde a extremidade da cauda do vírus se une à parede celular bacteriana. Em seguida, apenas o ácido nucléico do fago é injetado para dentro da célula hospedeira, enquanto que sua capa protéica permanece no exterior. No interior da célula hospedeira, o ácido nucléico do fago passa a controlar o metabolismo celular, de forma que a bactéria inicia a produção de novos fagos.

Decorrido um certo período, os vírus formados serão liberados através de uma ruptura da parede celular bacteriana denominada lise, permitindo, dessa forma, a liberação de novos fagos capazes de infectar outras células bacterianas sensíveis. Este processo, denominado de ciclo lítico, ocorre apenas quando uma bactéria suscetível é infectada por um fago virulento.

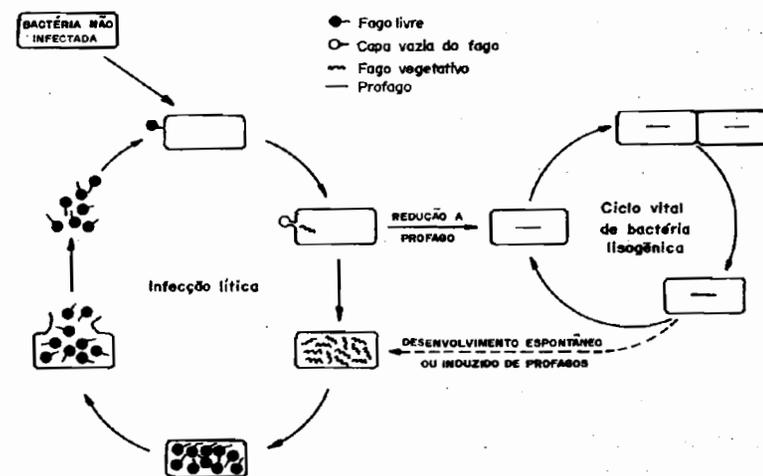


Figura 5. Ciclo de replicação de um bacteriófago (13).

Quando uma célula bacteriana é infectada por um fago não virulento, não ocorre lise da célula. Este fenômeno é denominado de lisogenia. O ácido nucléico injetado pelo fago não promove a síntese de material fágico, mas liga-se ao cromossomo bacteriano no estado de profago, passando a ser transmitido para as células filhas no processo de reprodução bacteriana. Sob certas condições naturais ou induzidas, pode ser reiniciada a síntese de fagos e a lise bacteriana (Figura 5).

Através de fagos lisogênicos pode ocorrer a transdução genética de certas bactérias. Outras maneiras de modificações genéticas em bactérias ocorrem através dos processos de conjugação e/ou de transformação (11).

Além dos bacteriófagos, também são encontrados no solo cianófitos e micófitos, vírus que infectam cianobactérias e fungos, respectivamente.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2.ed. New York, John Wiley, 1977, 472p.
2. CADMAN, C.H. Biology of soil borne viruses. Annu. Rev. Phytopath., Palo Alto, 1:143-172, 1963.
3. CARDOSO, C.O.N. Fungos. In: Galli, F. ed. Manual de fitopatologia. São Paulo, Ceres, 1978, p.58-123.
4. COSTA, S.O.P. da (coord.). Genética molecular e de microrganismos: Os Fundamentos de engenharia genética. São Paulo, Manole, 1987, 559p.
5. DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. Écologie microbienne du sol. Paris, Masson, 1970, 796p.
6. GARRETT, S.D. Soil fungi and soil fertility. 2.ed. Oxford, Pergamon Press, 1981, 150p.
7. HOLT, J.G. & KRIEG, N.R. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, 964p.
8. KRIEG, N.R. Systematics. In: GERHARDT, P., ed. Manual of methods of general bacteriology. Washington, Am. Soc. Microbiol., 1984, p.407-472.
9. LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Savier, 1984, 725p.
10. METTING, B. The systematics and ecology of soil algae. Bot. Rev., New York, 47:195-312, 1981.

11. PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.S.C. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1980, 2v.
12. Scientific American. A Célula Viva. São Paulo. Polígono, Editora da Universidade de São Paulo, 1969, 312p.
13. STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E.A. O Mundo dos micróbios. São Paulo, Blucher, 1969, 741p.
14. TAYLOR, C.E. Vectors of plant pathogens. In: HARRIS, K.F. & MARAMOROSCH, eds, New York, Academic Press, 1980. 647p.
15. WEBSTER, J. Introduction to fungi. 2.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1986.
16. WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. Science, Washington, 163:150-160, 1969.

COMO OS MICRORGANISMOS DO SOLO OBTÊM ENERGIA E NUTRIENTES

Maria Cristina P. Neves⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Todos os sistemas vivos requerem um suprimento de nutrientes e energia em quantidade e forma adequadas. Deste modo, para se compreender a função dos diversos grupos de microrganismos no sistema solo-plantas, bem como sua capacidade de sobrevivência, é necessário conhecer a maneira como eles satisfazem suas demandas de nutrientes e os mecanismos que desenvolveram para capturar, conservar e transferir a energia requerida para as biossínteses.

CATEGORIAS NUTRICIONAIS

A classificação em *autotróficos* e *heterotróficos*, tradicionalmente usada para caracterizar as categorias nutricionais dos seres vivos, é uma simplificação, principalmente quando usada para microrganismos, porque se baseia no conceito de que os *autotróficos*, também chamados de *litotróficos* (*lithos* = pedra; *trophus* = alimentação), são capazes de obter todo o carbono de que necessitam para suas sínteses a partir do CO₂, sendo inteiramente independentes de compostos orgânicos pré-existentes, enquanto que os *heterotróficos*, também chamados *organotróficos*, obtêm o carbono para suas biossínteses a partir de outros compostos orgânicos. Hoje, entretanto, são conhecidos microrganismos que, apesar de utilizarem compostos inorgânicos, são principal fonte de energia, e

⁽¹⁾ Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo - CNPDS/EMBRAPA, km 47 da antiga rodovia Rio-São Paulo, CEP 23851 Seropédica, RJ.

CO_2 como fonte de carbono, requerem especificamente compostos orgânicos, ou mesmo algumas vitaminas para que possam se desenvolver (11, 15, 18).

Esta classificação tem sido amplamente usada no sentido restrito de indicar a natureza da principal fonte de carbono para as biossínteses celulares, juntamente com termos que descrevem a natureza da fonte de energia empregada. Um grande grupo de microrganismos litotróficos obtém energia metabolicamente útil a partir da luz (15,23). Estes microrganismos são classificados como *fotolitotróficos*. Há, porém, microrganismos organotróficos que também são capazes de captar a energia luminosa, transformando-a em energia metabolicamente útil, sendo, porém, incapazes de assimilar o CO_2 . Estes microrganismos são ditos *fotorganotróficos*.

A energia necessária às biossínteses celulares pode também ser obtida da oxidação de compostos inorgânicos (enxofre elementar, íon amônio e ferro reduzido, por exemplo). Se, então, o CO_2 é a fonte de carbono, os microrganismos são ditos *quimiolitotróficos*. No caso de usarem compostos orgânicos como fonte de carbono são, então, chamados *quimiorganotróficos*. Deste modo, 4 classes são reconhecidas (Quadro 1), e o conceito de litotrofismo tem sido estendido aos *metilitrofos*, porque estes organismos podem crescer usando compostos orgânicos simples que contêm apenas grupos metila porém sem nenhuma ligação covalente carbono-carbono (12,26).

Quadro 1. Tipos de metabolismo

| Tipo | Fonte de energia | Fonte de carbono | Doador de elétron | Exemplo |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|--|---|
| Fotolitotrofia | Luz | CO_2 | H_2O $\text{H}_2\text{S}, \text{S}^0, \text{H}_2$ | Plantas superiores, algas, cianobactérias Bactérias, <i>Chlorobiaceae</i> e <i>Chromatiaceae</i> |
| Fotorganotrofia | Luz | Substâncias orgânicas | Substâncias orgânicas | Algumas algas, bactérias <i>Rhodospirillaceae</i> |
| Quimiolitotrofia | Substâncias minerais | CO_2 | Substâncias minerais | Nitrificadores, <i>Thiobacillus</i> |
| Quimiorganotrofia | Substâncias orgânicas | Substâncias orgânicas | Substâncias orgânicas | Animais, protozoários, fungos, maioria das bactérias |

Muitos microrganismos litotróficos também podem crescer usando compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono e são chamados *litotróficos facultativos*. Outros parecem ser *litotróficos obrigatórios*, como, por exemplo, certas espécies de *Thiobacillus* e *Nitrosomonas* e algumas cianobactérias. É

possível que o litotrofismo obrigatório seja uma decorrência de problemas técnicos de cultivo e não de uma inabilidade dos microrganismos de usarem compostos orgânicos como fontes de carbono e energia (21). Já se sabe que alguns microrganismos litotrofos quando em presença de glucose, crescem muito lentamente e geram subprodutos tóxicos que precisam ser removidos rapidamente para permitir a continuidade do crescimento. Muitos quimiolitotróficos, entretanto, podem crescer melhor em condições mixotróficas (compostos inorgânicos como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte adicional de carbono) do que em meio inteiramente inorgânico (21).

Muitas vezes a predominância de um tipo de nutrição depende da disponibilidade de oxigênio no meio ambiente. As *Rhodospirillaceae* (bactérias púrpuras sem enxofre) são fotorganotróficas, em condições anaeróbias, e quimiorganotróficas, em aerobiose. Nestes microrganismos, típicos de ambientes encharcados, a presença de oxigênio livre inibe a formação do pigmento responsável pela captação da energia luminosa. Em condições anaeróbias, porém, os pigmentos são produzidos, e os microrganismos passam a ser capazes de fotossintetizar, muito embora continuem usando compostos orgânicos como fonte de carbono. Sob condições anaeróbias, estes organismos também podem crescer no escuro. Nestas condições, a energia é obtida inteiramente do metabolismo fermentativo dos carboidratos (24).

Os microrganismos quimiorganotróficos ou podem usar uma fonte simples de carbono (carboidrato), ou requerer compostos mais complexos (aminoácido, vitaminas, etc.), por serem incapazes de sintetizá-los. Estes quimiorganotróficos são ditos *auxotróficos*, enquanto que aqueles sem exigências nutricionais complexas são chamados de *prototróficos*.

ENERGIA LUMINOSA

Microrganismos fotolitotróficos e fotorganotróficos utilizam a energia radiante do sol, transformando-a em energia química metabolicamente útil (10). No caso dos fotolitotróficos, o processo é acoplado à redução do CO_2 que é usado na produção dos diversos componentes celulares. O processo fotossintético requer a produção de pigmentos capazes de absorver a energia luminosa incidente. As *clorofilas* são os principais pigmentos encontrados nas plantas superiores, algas e cianobactérias e conferem a cor verde por absorverem o vermelho e o azul e transmitirem o verde. As bactérias fotossintéticas têm *bacterioclorofila*, que apresenta estrutura diferente daquela das clorofilas e com máximos de absorção de luz mais próximos da região do infravermelho. As bacterioclorofilas encontram-se normalmente associadas a pigmentos acessórios, também ativos fotossinteticamente, e que são os *carotenóides*, as *ficoeritrinas* e *ficocianinas*. O conjunto das *bacterioclorofilas* e pigmentos acessórios confere aos microrganismos colorações púrpúreas, vermelhas, marrons e verde-azuladas.

As bactérias fotolitotróficas reduzem o CO₂ através do ciclo de Calvin (17), porém a natureza dos compostos redutores (doadores de elétrons) varia entre os diferentes grupos de microrganismos (Quadro 2). Enquanto que algas e cianobactérias (semelhança das plantas superiores) obtêm o poder redutor através da fotólise da água, gerando H⁺ que é usado nas reduções e produzindo O₂ que é liberado para o meio ambiente (3), as bactérias fotolitotróficas usam compostos redutores, tais como o ácido sulfídrico, o tiosulfato ou o hidrogênio molecular encontrados nos ambientes anaeróbios onde vivem (pântanos, solos encharcados como os sob cultura de arroz inundado, lagos ou mesmo enseadas e mangues), não apresentando, portanto, evolução de O₂ (fotossíntese anoxigênica).

Quadro 2. Equação geral da fixação de CO₂ em algas e cianobactérias e em bactérias fotossintéticas

| | |
|-------------------------------------|--|
| Algas e cianobactérias | |
| $H_2O + luz + \text{poder redutor}$ | $+ CO_2 \rightarrow (CH_2O)_n + 1/2 O_2$ |
| ATP | |
| Bactérias fotossintéticas | |
| $H_2S + luz + \text{ATP}$ | $+ CO_2 \rightarrow (CH_2O)_n + S$ |
| poder redutor | |

O processo fotossintético das bactérias se diferencia daquele das plantas superiores, algas e cianobactérias (Quadro 3) por não apresentar o fotossistema II (fotofosforilação acíclica, 10). Durante a fotossíntese bacteriana são produzidos ATP (fotofosforilação cíclica) e, através de uma série de reações, é

Quadro 3. Fotossíntese bacteriana e fotossíntese das plantas superiores, algas e cianobactérias

| Características | Bactérias fotossintéticas | Plantas superiores algas e cianobactérias |
|-------------------------------|------------------------------|--|
| 1. Fonte de C | CO ₂ | CO ₂ |
| 2. Fonte de energia | luz | luz |
| 3. Doador de elétrons | H ₂ S, tiosulfato | H ₂ O |
| 4. Pigmento | bacterioclorofila | clorofila a, principalmente |
| 5. Produção de O ₂ | não | sim |
| 6. Fotofosforilação | presente | presente |
| 7. Fotofosforilação acíclica | ausente | presente |

produzido também o NADPH₂. As bactérias fotorganotróficas (entre elas as *Rhodospirillaceae*) usam a luz como fonte de energia para produção de ATP e compostos orgânicos como succinato, como doadores de elétrons, sendo que o CO₂ não se apresenta como a principal fonte de carbono para estes microrganismos (11). No caso das bactérias que utilizam H₂S, como poder redutor, o enxofre elementar produzido pode ser depositado no interior das células (na maioria das *Chromatiaceae*) ou, então, liberado para o meio ambiente (*Chlorobiaceae*; 20,25).

ENERGIA DA OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS INORGÂNICOS

Algumas espécies de bactérias do solo e de ambientes aquáticos podem obter energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos num processo acoplado à redução de CO₂ (6). Para estes microrganismos quimiolitotróficos, a redução de CO₂ para a produção dos compostos celulares é um processo semelhante ao dos fotolitotróficos (11). Porém, a energia para a produção de ATP é obtida através da fosforilação oxidativa, e os redutores para a fixação do CO₂ são obtidos junto a compostos redutores inorgânicos (12).

Várias substâncias redutoras podem servir de doadores de elétrons e energia para os processos de síntese, cada uma gerando quantidades distintas de energia (Quadro 4).

Quadro 4. Energia liberável na oxidação de compostos inorgânicos

| Reação | Energia liberável ⁽¹⁾ (kcal mol ⁻¹) | pH |
|--|--|-----|
| NH ₄ ⁺ + 1 1/2 O ₂ | NO ₂ ⁻ + 2H ⁺ + H ₂ O + 66 | 7 |
| NO ₂ ⁻ + 1/2 O ₂ | NO ₃ ⁻ + 18 | 7 |
| H ₂ S + 1/2 O ₂ | S + H ₂ O + 50 | 7 |
| S + 1 1/2 O ₂ + H ₂ O | SO ₄ ²⁻ + 2H ⁺ + 140 | 7 |
| Fe ²⁺ + H ⁺ + 1/4 O ₂ | Fe ³⁺ + 1/2 H ₂ O + 17 | 2-3 |
| H ₂ + 1/2 O ₂ | H ₂ O + 57 | 7 |
| CO + 1/2 O ₂ | CO ₂ + 61 | 7 |

(1) Dados para Fe²⁺ tirados de Lees et al. (16). Outros dados calculados a partir da energia livre de formação dos compostos segundo Brock (1).

COMPOSTOS NITROGENADOS

Amônia e nitrito são oxidados pelas bactérias *nitrificadoras* numa sequência de reações cujo produto final é o nitrato (7). Espécies dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* e *Nitrosovibrio* oxidam a amônia até nitrito, enquanto que espécies do gênero *Nitrobacter* oxidam nitrito a nitrato (Capítulo 8).

As bactérias nitrificantes desempenham um papel importante no solo, pois, ao oxidarem a amônia liberada da matéria em decomposição, promovem a acidificação do solo. Por outro lado, como o íon amônio é mais facilmente fixado nas argilas e substâncias húmicas do solo, sua transformação em íon nitrato, que é facilmente lixiviável do solo, promove extensas perdas de nitrogênio do sistema solo-plantas, além das perdas de nitrato pelo processo de desnitrificação. Deste modo, o processo de nitrificação pode contribuir para um menor aproveitamento dos adubos nitrogenados pelas culturas, e vários inibidores da nitrificação têm sido estudados, entre eles, o N-sérve (2 cloro (6 triclórometil) piridina) de ação específica sobre as cupro-proteínas responsáveis pela oxidação da amônia. Há também inibidores naturais, como o aminoácido metionina.

COMPOSTOS REDUZIDOS DE ENXOFRE

Diversos compostos reduzidos de enxofre, tais como ácido sulfídrico, enxofre elementar e tiosulfato, são usados por bactérias quimiolitotróficas (gêneros *Thiobacillus*, *Thiothrix* e *Beggiatoa*), para promover a fosforilação oxidativa, gerando ATP e redutores necessários à fixação do CO₂ em um processo fotossintético *anoxigênico* (Quadro 4). Os produtos formados são o enxofre elementar, que pode ser depositado no citoplasma ou excretado pela célula, e o ácido sulfúrico. Por essa razão, é observada uma diminuição drástica no pH do solo, que pode chegar a valores próximos de 1, como consequência do metabolismo destes microrganismos (Capítulo 22).

HIDROGÊNIO MOLECULAR

Inúmeros microrganismos são capazes de utilizar o hidrogênio molecular, para obter energia e poder redutor necessários à redução do CO₂. Estes organismos são todos quimiolitotróficos facultativos podendo usar tanto o hidrogênio para obter energia e reduzir o CO₂, como compostos orgânicos (11).

Através da ação da enzima *hidrogenase*, o hidrogênio é usado para reduzir o NAD a NADH₂, enquanto que a oxidação do H₂, através da fosforilação oxidativa gera ATP, usado para fixar o CO₂ através da via redutora da pentose-fosfato (4).

Espécies de microrganismos oxidantes de hidrogênio são encontradas nos gêneros *Hydrogenomonas*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodospseudomonas*, além de bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Azotobacter*.

Alguns microrganismos (por exemplo: *Methanobacterium thermoautotrophicum*) são capazes de produzir compostos orgânicos, a partir de carbono mais reduzido do que o CO₂ (como por exemplo, o metano), usando o hidrogênio molecular como redutor (Quadro 4). Estes microrganismos metanogênicos são anaeróbios obrigatórios. O ciclo de Calvin não é envolvido no mecanismo de síntese, de modo que os constituintes celulares são produzidos a partir da síntese de novo de acetil coenzima A a partir do CO₂ (4).

OUTRAS OXIDAÇÕES GERADORAS DE ENERGIA

A oxidação de ferro ferroso a ferro férrico também pode gerar energia para promover a fosforilação oxidativa, porém, como a energia disponível é pequena (4), uma grande quantidade de substrato precisa estar presente, de modo a permitir o crescimento dos microrganismos (Quadro 4). As bactérias oxidantes do ferro (*Thiobacillus ferrooxidans*) só são encontradas em ambientes com baixos valores de pH, pois o íon ferroso é espontaneamente oxidado em condições neutras ou ligeiramente alcalinas (16).

Além do íon ferroso, também o monóxido de carbono pode ser oxidado gerando energia para as reações de síntese dos microrganismos. As bactérias do gênero *Carboxidomonas* promovem a oxidação do monóxido de carbono, gerando poder redutor e ATP e podem ser importantes na desintoxicação de ambientes poluídos. Sua importância, porém, ainda não foi avaliada.

LIBERAÇÃO DE ENERGIA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

A energia acumulada nos compostos orgânicos produzidos pelos microrganismos litotróficos, a partir da energia luminosa ou química ou então obtida do meio ambiente pelos microrganismos organotróficos é convertida em outras formas de energia, permitindo o desenvolvimento e a multiplicação das células (8).

A liberação da energia acumulada nos compostos orgânicos é processada através de reações de óxido-redução, ou seja, o composto orgânico energético se torna oxidado enquanto alguma outra substância se torna reduzida, ocorrendo, assim, uma transferência de elétrons da substância doadora (que se oxida), para a substância receptora (que se reduz).

Os microrganismos diferem quanto à natureza do receptor final de elétrons usado em suas reações de óxido-redução (Figura 1). As reações de

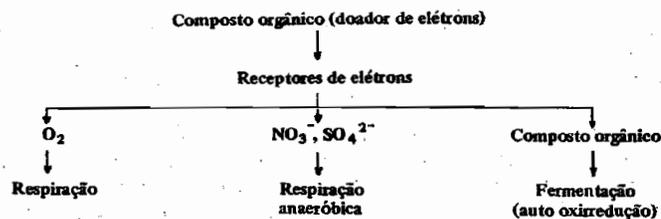


Figura 1. Liberação de energia de compostos orgânicos. Fluxo de elétrons.

óxido-redução podem se dar mesmo sem um receptor externo de elétrons. Deste modo, os processos metabólicos para oxidação de matéria orgânica e liberação de energia podem ser separados em três grupos principais: *fermentação*, na qual a oxidação ocorre sem a utilização de receptores externos de elétrons; *respiração aeróbica*, na qual o oxigênio é o receptor final dos elétrons; e *respiração anaeróbica*, na qual são empregados receptores de elétrons inorgânicos, diferentes de oxigênio, como NO_3^- e SO_4^{2-} .

FERMENTAÇÃO

É um processo de oxidação parcial do composto orgânico através de auto-oxi-reduções, na ausência de receptores externos de elétrons. Neste processo, há liberação de apenas uma parte da energia contida no composto original (1 a 2 ATP/mol glicose), e os produtos da reação ainda são ricos em energia (5). Estes produtos orgânicos são excretados pelos organismos e se acumulam no meio (18), o que possibilita a exploração industrial dos processos fermentativos, como é o caso da fermentação alcoólica e láctica, entre outras (Quadro 5). Nos sistemas naturais, por outro lado, formam-se cadeias nutricionais ou tróficas, onde o sub-produto do metabolismo de um microrganismo serve de material energético para outro (Capítulos 3 e 4).

RESPIRAÇÃO AERÓBIA

Na presença de receptores externos de elétrons, a liberação de energia dos compostos orgânicos é muito mais eficiente. Durante o processo respiratório, que usa o O_2 como receptor de elétrons, todo o carbono da molécula do substrato é oxidado até CO_2 , com concomitante produção de 37 - 38 ATP/mol glicose (17). Enquanto que, no processo fermentativo, os elétrons são transferidos

Quadro 5. Produtos de fermentação de alguns microrganismos

| Microrganismos | Substrato | Produto |
|--|-----------------------------------|---|
| Leveduras (<i>Saccharomyces</i>) | glucose | etanol e CO_2 |
| Bactérias lácticas (<i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i>) | glucose | ácido láctico |
| Bactérias anaeróbicas <i>Clostridium acetobutylicum</i> | glucose, glicerina ou piruvato | acetona, butanol, etanol, CO_2 e H_2O |
| <i>C. butylicum</i> | glucose | ácido butírico, ácido acético, butanol, CO_2 e H_2O |
| <i>Propionibacterium</i> | glucose, sacarose, lactose | ácido propiônico |

para substâncias orgânicas, no processo respiratório, os elétrons são transferidos para o oxigênio, formando água e produzindo ATP de uma maneira muito eficiente.

Dentre os microrganismos aeróbicos, destaca-se um grupo de bactérias, cujo metabolismo é afetado em meios contendo altas concentrações de oxigênio livre em solução. Estes microrganismos, chamados *microaerofílicos*, requerem uma taxa de difusão de oxigênio nunca superior à taxa de utilização de O_2 no processo respiratório. As bactérias fixadoras de nitrogênio, dos gêneros *Rhizobium* e *Azospirillum*, por exemplo, requerem condições microaerofílicas, para que possam crescer diazotroficamente (ou seja, usando o nitrogênio atmosférico como fonte de nitrogênio). Isto acontece devido à alta sensibilidade da enzima *nitrogenase*, responsável pela redução do nitrogênio, que é reprimida em presença de oxigênio livre (Capítulo 10).

RESPIRAÇÃO ANAERÓBIA

Dentre as substâncias que podem receber os elétrons gerados nas reações de óxido-redução de compostos orgânicos, estão os íons NO_3^- e SO_4^{2-} , sendo o processo de fosforilação oxidativa muito semelhante ao que ocorre no processo de respiração aeróbica. O nitrato é o mais amplamente usado e, durante o processo, é reduzido a NO_2^- , N_2O , N_2 (7). Este processo é chamado de desnitrificação e difere do processo de redução assimilatória do nitrato por produzir produtos gasosos, sendo responsável por grande parte das perdas de nitrogênio do solo (Figura 2). São conhecidos pelo menos 71 gêneros de microrganismos que utilizam NO_3^- , em lugar do O_2 , como receptor de elétrons, sendo a maioria formada de facultativos, isto é, são também capazes de utilizar O_2 como receptor de elétrons (2). A energia obtida utilizando-se o NO_3^- como receptor de elétrons é cerca de 10% inferior a que se obteria usando-se oxigênio. No entanto, o processo representa uma alternativa que pode permitir a sobrevivência do microrganismo, quando o ambiente

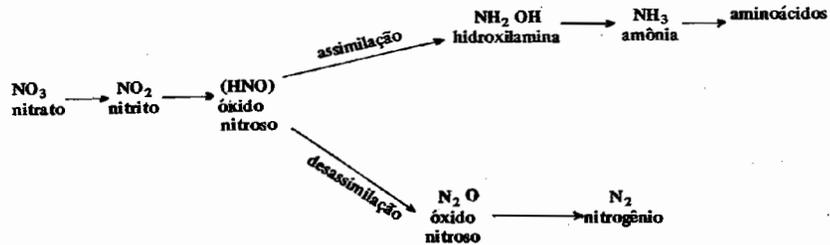


Figura 2. Redução assimilatória e dissimilatória do nitrato.

se torna temporariamente anaeróbio, como é o caso de solos onde substâncias orgânicas facilmente oxidáveis (vinhaça, por exemplo) foram incorporadas (19). O intenso metabolismo que se segue à aplicação da vinhaça reduz a disponibilidade de oxigênio, criando sítios anaeróbios no solo que podem promover perdas de nitrogênio pelo processo de desnitrificação.

O sulfato também pode ser usado como receptor de elétrons por algumas bactérias (4). Durante o processo de redução dos sulfatos é formado H_2S . Entretanto, somente um pequeno grupo de microrganismos anaeróbios obrigatórios pertencentes a sete gêneros - *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfolobus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* e *Desulfosarcina* - é capaz de usar este receptor de elétrons. Destes gêneros, os primeiros são quimiorganotróficos (*Desulfovibrio* pode também crescer mixotroficamente), enquanto que os dois últimos são quimiolitotróficos, capazes de crescer com H_2 , CO_2 e sulfato (20). Estes organismos têm considerável importância ecológica e econômica. São encontrados em ambientes encharcados onde a conversão do sulfato em gás sulfídrico causa mortandade de peixes e outros animais e também são responsáveis pela corrosão de tubulações metálicas (ferro e aço), que necessitam proteção superficial especial. Dentre as atividades benéficas destas bactérias está a formação de depósitos de enxofre (Capítulo 22).

Os microrganismos metanogênicos também desenvolvem respiração anaeróbia, sendo anaeróbios obrigatórios. O processo envolve a redução do CO_2 a metano, mas o mecanismo de conservação de energia difere fundamentalmente do mecanismo da fosforilação oxidativa e é apenas parcialmente entendido (12).

FONTES DE NUTRIENTES PARA OS MICRORGANISMOS

Para viver, os microrganismos não dependem só da energia e do carbono. O material celular é constituído de inúmeros elementos que devem estar

disponíveis no meio ambiente, de modo a permitir o desenvolvimento e a multiplicação dos microrganismos (14).

NITROGÊNIO

Este elemento é necessário em quantidades relativamente grandes, por fazer parte da estrutura dos aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucléicos e algumas vitaminas.

O nitrogênio é assimilado preferencialmente na forma de amônio, por ser esta a forma em que é incorporado nos compostos orgânicos. No entanto, fungos, algas e algumas bactérias também são capazes de utilizar o NO_3^- , após reduzi-lo a amônia. Certas bactérias, cianobactérias e actinomicetos são diazotróficos, isto é, podem usar diretamente o nitrogênio atmosférico através do processo de fixação biológica do nitrogênio (discutida no capítulo 10).

Formas orgânicas de nitrogênio também podem ser usadas como fonte de nitrogênio por microrganismos capazes de decompor as moléculas orgânicas e liberar o íon amônio que é então reincorporado nos compostos orgânicos celulares.

FÓSFORO E ENXOFRE

O fósforo está presente nos microrganismos sob a forma de nucleotídeos, ácidos nucléicos e fosfossacarídeos. Os microrganismos podem obter o fósforo do solo através da acidificação do meio em que vivem ou através da ação de fosfatases que rendem o fosfato solúvel para ser assimilado (Capítulo 18).

O enxofre faz parte da estrutura dos aminoácidos, cistina, cisteína e metionina, bem como das vitaminas, biotina e tiamina (Capítulo 22). O enxofre é absorvido na forma de sulfatos que são reduzidos a grupos sulfidrila, nas células (1, 14).

OUTROS ELEMENTOS MINERAIS

Diversos elementos são necessários aos microrganismos, relacionados principalmente ao funcionamento das várias enzimas. Os macronutrientes potássio, magnésio e cálcio são necessários em concentrações de 10^{-3} a 10^{-4} M, enquanto que os micronutrientes, são necessários em concentrações de 10^{-6} a 10^{-8} M, o que torna tecnicamente impossível demonstrar deficiência de micronutrientes em microrganismos. Apesar disso, algumas espécies sensíveis a concentrações de certos micronutrientes têm sido usadas em testes biológicos, como por exemplo,

o *Azotobacter paspali* que necessita de molibdênio para produção da enzima nitrogenase, a qual permite o crescimento diazotrófico do microrganismo. Deste modo, em meio sem nitrogênio e molibdênio, adicionado, porém, de amostras de solo, o crescimento de *Azotobacter* é proporcional à quantidade de Mo presente na amostra de solo (9; Capítulo 23).

FATORES DE CRESCIMENTO

Como já foi mencionado anteriormente, muitos microrganismos ditos litotróficos requerem certos compostos orgânicos específicos por serem incapazes de sintetizá-los. Este grupo de litotróficos é chamado auxotrófico. Os compostos orgânicos que requerem são em geral fatores de crescimento como vitaminas e aminoácidos.

ABSORÇÃO DOS NUTRIENTES DO MEIO AMBIENTE

Os nutrientes necessários e diversas funções celulares (fontes de energia, receptores de elétrons e material para as sínteses celulares) devem ser absorvidos do meio ambiente, ou seja, devem penetrar nas células dos microrganismos. Para compostos de pequeno peso molecular, a absorção é relativamente simples e se dá seletivamente através da membrana citoplasmática que tem a propriedade de ser semi-permeável (4). A absorção de nutrientes através da membrana pode se dar por simples difusão. Neste caso, a taxa de transporte é proporcional ao gradiente de concentração, ao tamanho das moléculas e a sua solubilidade nos lipídios da membrana. Entretanto, poucos nutrientes podem ser absorvidos desta maneira. Os nutrientes de maior peso molecular e baixa solubilidade necessitam de uma *difusão facilitada*, processo que envolve um sistema transportador. Estes dois processos de difusão são processos de *transporte passivo*, pois a energia necessária para o transporte se deriva da agitação térmica das próprias moléculas do nutriente (13).

Há, entretanto, nutrientes que requerem um transporte ativo para serem absorvidos pelas células. Neste caso, energia na forma de ATP é consumida no processo de absorção. A maior parte dos íons inorgânicos, monossacarídeos e aminoácidos são absorvidos por transporte ativo que é altamente seletivo, devido a mediação de enzimas específicas para cada substância e conhecidas como *permeases* (13).

Os nutrientes utilizados como fonte de energia para a população quimiorganotrófica incluem muitas vezes compostos de alto peso molecular tais como celulose, amido, proteínas, hemiceluloses, quitina, entre outros. As células

dos microrganismos são impermeáveis a estas moléculas complexas que necessitam ser digeridas extracelularmente para então serem absorvidas. A digestão extracelular de substâncias complexas é mediada por enzimas excretadas pelas células e denominadas *exoenzimas*, as quais são, na grande maioria, hidrolases, ou seja, hidrolizam os compostos de alto peso molecular em suas subunidades. Deste modo, o amido e a celulose são convertidos a glicose, e as proteínas em aminoácidos (22). As exoenzimas podem ser adsorvidas pelos minerais da argila, permanecendo viáveis, mesmo após a morte do microrganismo que as produziu.

Entre os microrganismos que compõem a microbiota, além da absorção, também é comum a obtenção de nutrientes pelo processo de *ingestão* ou *fagocitose*. Neste processo, partículas sólidas, tais como, bactérias inteiras, são transportadas para o interior das células, graças a invaginações da membrana e formações de pequenas vesículas que promovem a digestão do material ingerido. O processo possivelmente requer energia, não tendo, porém, natureza seletiva.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para sobreviverem no solo, que é um ambiente em constante modificação, os microrganismos se adaptaram para utilizar as mais diversas fontes de energia (luz, oxidação de compostos inorgânicos e dissimilação de quase todas as substâncias orgânicas concebíveis) e sob as mais diversas condições ambientes (por exemplo, condições variáveis de concentração de oxigênio, temperatura, etc.). A adaptação para a vida no solo, faz, inclusive, com que ocorram, com certa frequência, espécies de microrganismos com extraordinária *plasticidade nutricional* e que podem mudar seu conjunto de enzimas, para assim, sobreviverem nas mais diversas condições, explorando situações (aeróbias ou anaeróbias, litotróficas ou organotróficas), ou mesmo diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

LITERATURA CITADA

1. BROCK, T.D. Biology of microorganisms. 3.ed., New Jersey, Prentice Hall, 1979.
2. CAMPBELL, N.E.R. & LEES, H. The nitrogen cycle. In: Mc LAREN, A.D. & PETERSON, G.H., eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1967, p.194-215.
3. CHENIAE, G.M. Photosystem II and O₂ evolution. Ann. Rev. Plant Physiol., Palo Alto, 21:467-498, 1970.
4. DAWES, E.A. Microbial energetics. Glasgow. Blackie & Son, 1986. 187p.
5. DECKER, JUNGERMANN, K. & THAUER, R.K. Energy production in anaerobic organisms. ANGEW. CHEM. INTERN. ed. 9:138-158. 1970.

6. DELWICHE, C.C. Energy relationships in soil biochemistry. In: McLAREN, A.D. & PETERSON, G.H. eds., Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1967. p.173-193.
7. DELWICHE, C.C. Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. New York, John Wiley & Sons, 1981, 286p.
8. DOELLE, H.W. Bacterial metabolism. 2.ed. New York, Academic Press, 1975.
9. FRANCO, A.A.; PERES, J.R.R. & NERY, M. The use of *Azotobacter paspali* N₂-ase (C₂H₂ reduction activity) to measure molybdenum deficiency in soils. Pl. Soil, Hague, 50:1-11, 1979.
10. GEST, H. Energy conversion and generation of reducing power in bacterial photosynthesis. Adv. Microb. Physiol., New York, 7:243-282, 1972.
11. GOTTSCHALK, G. Bacterial metabolism. New York, Springer-Verlag, 1979. 281p.
12. HAMILTON, W.A. Energy sources for microbial growth: An overview. In: CODD, G.A., ed. Aspects of microbial metabolism and ecology. London, Academic Press, p.35-57.
13. HAROLD, F.M. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriol. Rev., Baltimore, 36:172-230, 1972.
14. HUTNER, S.H. Inorganic nutrition. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 26:313-346, 1972.
15. KELLY, D.P. Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 25:177-210, 1971.
16. LEES, H.; KWOK, S.C. & SUZUKI, I. The thermodynamics of iron oxidation by the ferrobacilli. Can. J. Microbiol., Ottawa, 15:43-46, 1969.
17. LEHNINGER, A.L. Biochemistry 2.ed., New York, Worth Publishers., 1975. 770p.
18. MOAT, A.G. Microbial physiology. New York, John Wiley & Sons, 1979. 600p.
19. NEVES, M.C.P.; LIMA, I.T. & D'OBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 7:131-136, 1983.
20. POSTGATE, J.R. The sulphate-reducing bacteria. 2.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1984. 208p.
21. RITTENBERG, S.C. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. Adv. Microb. Physiol., New York, 3:159-196, 1969.
22. SKUJINS, J.J. Enzymes in soil. In: McLAREN, A.D. & PETERSON, G.H. eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Decker, 1967. p.371-414.
23. STAINER, R.Y.; ADELBERG, E.A. & INGRAHAM, J.L. General microbiology. 4.ed., London, MacMillan, 1977.

24. THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K. & DECKER, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev., Baltimore, 41:100-180, 1977.
25. TRUPER, H.G. Photolithotrophic sulfur oxidations. In: BOTHE, H. & TREBST, A. eds. Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Berlin. Springer-Verlag, 1981. p.199-211. (Proceedings in Life Sciences)
26. WITTENBURY, R. & KELLY, D.P. Autotrophy: A conceptual phoenix. In: HADDOCK, B.A. & HAMILTON, W.A. eds. Microbiol. Energetics. Cambridge, Cambridge University Press, 1977, p.121-149.

ECOLOGIA MICROBIANA DO SOLO

Elke J.B.N. Cardoso⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

A ecologia microbiana estuda a atuação ou atividade dos microrganismos e suas interações entre si e com outros seres vivos dentro de determinado *habitat*. Obviamente, faz parte dos estudos ecológicos o efeito que os diferentes fatores ambientais exercem sobre os microrganismos, bem como a atuação destes sobre os parâmetros físicos, químicos ou biológicos do *habitat* (Capítulo 5).

Segundo Odum (6) o *habitat* pode ser entendido como o local (endereço) de determinado ser, enquanto que o nicho expressa a sua função fisiológica (profissão).

O solo pode ser encarado como um *habitat* microbiano por excelência, local de vida de inúmeras e variadas populações de todos os tipos de microrganismos e mesmo como o reservatório final da grande diversidade genética de quase todos eles. Tanto que, dentro de extensos programas de pesquisa para obtenção de microrganismos úteis (produtores de antibióticos ou de enzimas, certos tipos de fermentadores ou degradadores de substâncias específicas, organismos antagônicos a patógenos ou pragas, etc), recorre-se ao isolamento massal de populações do solo, seguido de testes para se determinarem as aptidões específicas de cada isolado para a característica desejada.

Entretanto, o solo não deve ser visto como um único *habitat* de grande extensão geográfica. Pelo contrário, ele se constitui de inúmeros microsítios, caracterizados não apenas pelas condições edafoclimáticas, mas ainda por

⁽¹⁾ Departamento de Ciência do Solo -- ESALQ/USP, Caixa Postal 9, CEP 13400 Piracicaba, SP.

fatores peculiares, como presença de uma partícula de matéria orgânica, de uma raiz vegetal, de um microporo saturado de água, de maior ou menor facilidade de trocas gasosas, etc. E tais características podem variar muito entre locais que distem entre si de não mais do que alguns milímetros. Conclui-se, portanto, que, mesmo quando se considera um terreno de dimensões restritas, constituído pelo mesmo tipo de solo, lida-se com grande número de *microhabitats* microbianos que diferem entre si.

Sem dúvida, essa é uma das razões responsáveis pela dificuldade em se obterem informações precisas sobre a composição quantitativa e qualitativa de comunidades microbianas do solo, tornando problemática a própria obtenção de amostras representativas. Alie-se a esse fato uma série de dificuldades metodológicas na contagem de microrganismos por observação direta ao microscópio ou pela diluição em série e plaqueamento. Para exemplificar tal dificuldade, pode-se citar o levantamento de fungos de solo sob florestas, através da técnica de diluições e posterior avaliação em placas de petri, contendo meio de cultura "seletivo" para fungos. Normalmente se observa grande predominância de fungos imperfeitos e de alguns Zigomicetos. Estes fungos são, na sua maioria, "fungos do açúcar" (4) que respondem ativamente à adição de matéria orgânica simples com rápido crescimento e esporulação abundante. Desaparecendo essa fonte de matéria orgânica facilmente disponível, seus talos morrem e eles permanecem metabolicamente inativos na forma de esporos ou conídios. Por outro lado, sabe-se que muitos basidiomicetos apresentam crescimento ativo pelo solo e mantêm relações de simbiose ou de parasitismo com as raízes de essências florestais. Contudo, dificilmente se isola um único basidiomiceto pelas técnicas correntes nesses estudos, talvez pela falta de adaptação aos meios de cultura empregados.

COLONIZAÇÃO E CADEIAS TRÓFICAS

Uma característica generalizada do solo (pelo menos durante longos períodos) é a sua deficiência em matéria energética (carbono orgânico) para os microrganismos. Na maior parte do tempo, as comunidades microbianas do solo encontram-se em estado de inanição, com o metabolismo afetado ou mesmo suspenso devido às condições de estresse. Eis uma razão, aliada à grande competição por nutrientes, que faz com que certos processos, os quais ocorrem ativamente *in vitro*, com microrganismos isolados e mantidos em condições nutritivas e ambientes ótimas, dificilmente possam ser detectados ou considerados em grande escala em solo natural (p. ex., a solubilização microbiana de fosfatos ou a antibiose).

Para comprovar a afirmação acima, basta observar a resposta à adição de matéria orgânica ao solo. Ocorre uma intensa multiplicação e grande crescimento microbiano, uma verdadeira explosão populacional, que se mantém até que a matéria energética tenha sido consumida e volte a ser o fator limitante.

Cada *microhabitat* do solo oferece certa quantidade de nichos para a comunidade microbiana. Em geral, quanto mais simples o *habitat*, menor será o número de nichos disponíveis e, quanto mais complexo, maior. A própria atividade microbiana pode contribuir para ampliar os nichos disponíveis (através da decomposição enzimática de certo composto, fornecendo novos substratos a outros grupos; imobilizando o nitrogênio mineral e com isso tornando a relação C:N adequada para os fixadores de nitrogênio; consumindo todo o oxigênio disponível através da rápida oxidação da matéria orgânica, o que torna o ambiente temporariamente anaeróbio; excretando substâncias acidificantes ou alcalinizantes; etc., etc.).

Para que um substrato recém-introduzido num ecossistema possa ser eficientemente colonizado por microrganismos, há os mecanismos de dispersão ou disseminação microbiana, os quais permitem a presença de inúmeros propágulos na imediação de um substrato potencialmente colonizável. Entre os invasores ou colonizadores pioneiros, ocorre competição, sendo que o ambiente seleciona os mais aptos. A maior ou menor habilidade competitiva de uma população pode ser decorrência de fatores, tais como, velocidade de crescimento, rápida assimilação de nutrientes, tolerância a todos os fatores bióticos e abióticos encontrados, presença de mecanismos que superem as "barreiras à colonização" do substrato, plasticidade nutricional, etc.

À medida em que um substrato vai sendo degradado, ocorre uma modificação das condições, induzida pelo próprio metabolismo dos organismos colonizadores, de forma a favorecer outros tipos de microrganismos, enquanto os pioneiros vão sendo eliminados. Ocorre, então, uma sucessão de populações e de comunidades, que também é denominada de cadeia trófica. Finalmente, estabelece-se um ecossistema em condições de clímax, quando as modificações quase já não mais acontecem.

Considerando a maioria dos solos agrícolas, pode-se observar que estes são normalmente constituídos de *microhabitats* muito complexos, ainda mais se considerarmos também a presença das plantas e de elementos da meso e macrofauna. Qualquer prática agrícola (aração, adubação, calagem, incorporação de matéria orgânica, irrigação, aplicação de agrotóxicos, etc.) pode afetar os nichos disponíveis através de intervenções nas características físico-químicas ou biológicas do ecossistema. E a cada modificação profunda corresponde uma renovação da pressão de seleção, favorecendo alguns componentes da microbiota e eliminando outros, e remanejando o estado de equilíbrio entre as populações. Considerando-se que esse ecossistema permanece relativamente inalterado durante um certo período de tempo, sem intervenções drásticas, observar-se-á também a manutenção do estado de equilíbrio dinâmico entre as populações microbianas, com todos os nichos ocupados pelas populações mais aptas, através da seleção natural. A tal ecossistema (solo) refere-se como em estado de clímax, o qual pode ser definido pela homeostase.

HOMEOSTASE

Homeostase é o princípio pelo qual um ecossistema tende a manter a sua composição biótica relativamente constante. É uma verdadeira recalitrância ou impedimento à modificação biológica e pode ser definida como o conjunto de todos os mecanismos que auxiliam na manutenção do equilíbrio.

Uma consequência natural do fenômeno da homeostase é o fato de que, geralmente, a inoculação de sementes ou a infestação do solo, mesmo com grande quantidade de certo microrganismo selecionado *in vitro*, não resulta nas consequências esperadas e nem mesmo no estabelecimento desse microrganismo no solo. Como exemplos, podemos citar a prática outrora comum na União Soviética de inocular sementes de diversas culturas com *azotobacterin* ou com *fosfobacterin*, inoculantes constituídos de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre ou solubilizadoras de fosfato, respectivamente (1). Também, a simples inoculação de microrganismos antagonísticos, visando ao controle biológico de certos fitopatógenos, costuma resultar em fracasso, enquanto que a modificação de características físico-químicas do solo, favorecendo antagonistas e prejudicando os patógenos, chegou a transformar solos condutivos a uma doença em solos supressivos.

Constituem-se exceções à regra exposta acima os casos nos quais a inoculação é feita com microrganismos que apresentem uma vantagem seletiva frente à microbiota predominante do solo, como acontece com certas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal que são ativas colonizadoras do rizoplane. No caso da inoculação de *Rhizobium* em leguminosas, prática extremamente vantajosa e econômica para a cultura da soja e de outras leguminosas no Brasil (Capítulo 9), e no caso da transmissão de fitopatógenos junto a sementes ou mudas de certas culturas, o seu estabelecimento é decorrência do fato de que, estes microrganismos conseguem utilizar um nicho ainda desocupado, ou seja, penetram e se estabelecem em raízes de hospedeiros que lhes permitem evadir-se da rizosfera e com isso da competição e do antagonismo que imperam nessa região.

CLASSIFICAÇÃO ECOLÓGICA DE MICRORGANISMOS

Do ponto de vista ecológico, o maior interesse nas populações microbianas do solo está situado em sua função (nichos ecológicos) dentro do ecossistema e nas interações que possam ocorrer entre elas. Assim, sob este aspecto, podemos classificar as bactérias em amonificadoras, nitrificadoras, nitrato-redutoras ou denitrificantes, sulfuro-redutoras, diazotróficas, celulolíticas, amilolíticas, e assim por diante. Para se obter maior informação ecológica sobre a microbiota de um solo, é fundamental proceder-se a um levantamento funcional

dos microrganismos, o que se reflete no melhor conhecimento de sua atividade. Esse conhecimento é mais importante do que a simples quantificação de unidades taxonômicas.

Com relação aos fungos, já em 1976, Garret (4) tentou fazer uma classificação ecológica, a qual é apresentada abaixo com pequenas modificações:

1. Fungos que habitam raízes:

- a. **Micorrízicos ecto** - *Boletus, Amanita, Telephora, Pisolithus, etc.*
endo - *Rhizoctonia, Glomus, Gigaspora, etc.*
- b. **Parasitas especializados**: *Armillaria mellea, Fomes annosus, Ophiobolus graminis, etc.*

2. Fungos que habitam o solo

- a. **Parasitas não especializados, saprófitas fracos**: *Pythium, Rhizoctonia, Fusarium, etc.*
- b. **Saprófitas obrigatórios**
 - b.1. Fungos que utilizam açúcares solúveis: vários Zigomicetos e Deuteromicetos - crescimento rápido e abundante esporulação.
 - b.2. Fungos celulolíticos - intermediários entre b.1 e b.3 - *Trichoderma, Penicillium, etc.*
 - b.3. Fungos lignolíticos - Basidiomicetos superiores
 - b.4. Fungos coprófilos - *Pilobolus, Ascodesmus, Sordaria, Coprinus.*
- c. **Fungos predatórios** - capturam e parasitam amebas e nematóides - ordens Zoophagales (Oomicetos) e Mórtilias (Deuteromicetos).

Outro aspecto ecológico interessante está relacionado com o fenômeno bastante difundido da fungistase ou da bacteriostase de um solo. Verificou-se que muitos esporos de fungos não germinam em solo natural, pois, para que possam germinar, é preciso esterilizar o solo e/ou adicionar uma fonte energética. As hipóteses mais aceitas para explicar tal fenômeno são: a) presença de substâncias voláteis inibitórias, provenientes do metabolismo de outro microrganismo do solo ou de origem abiótica (3) ou b) deficiência de nutrientes ou dreno de nutrientes do propágulo em questão, por outros microrganismos do solo (5). A fungistase é de vantagem ecológica para os fungos, visto que impede a germinação de propágulos em habitats desprovidos de nutrientes que garantam a sobrevivência e reprodução do indivíduo. Normalmente, o efeito fungistático é anulado na rizosfera pela presença de exsudatos de raízes (7).

INTERAÇÕES MICROBIANAS

Nem sempre um fenômeno observado é consequência da atividade fisiológica de um único tipo de microrganismo. Especialmente em *habitats* que apresentam alta densidade de populações, como na rizosfera, ocorrem interações positivas ou negativas entre essas populações.

As principais interações microbianas podem ser assim classificadas (resumidas de Cardoso, 2):

Neutralismo -- não há interação. Embora fisicamente próximas, as populações ocupam nichos diferentes.

Comensalismo -- uma população é beneficiada (por exemplo, através da excreção de uma vitamina pela segunda população) e esta não é afetada.

Protocooperação -- intercâmbio de compostos entre duas populações, favorecendo a ambas, sem ocorrência de simbiose. Também denominada de **sintrofismo** e/ou **sinergismo**.

Simbiose mutualística -- interação íntima morfológica e fisiológica entre duas populações, ocorrendo benefício mútuo.

Simbiose antagonica ou Parasitismo -- interação morfológica e fisiológica íntima entre duas populações, beneficiando o parasita e prejudicando o hospedeiro.

Predação -- "Caça" de uma população sobre a outra. O predador é beneficiado e a presa prejudicada.

Competição - Rivalidade ou luta entre duas populações de nichos semelhantes por um fator limitante. Ambas são prejudicadas, embora freqüentemente a mais apta acabe predominando.

Amensalismo ou Antagonismo -- uma população é prejudicada por um fator (ex.: toxina) produzido pela outra população; esta não é afetada. Às vezes deve-se admitir que a população antagonica possa ser favorecida pela eliminação da outra, sua competidora.

LITERATURA CITADA

1. BROWN, M. E. Seed and root bacterization. Annu. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 12:181-197, 1974.
2. CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microrganismos. In: Galli, coord. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos 2.ed., São Paulo, Ceres, 1978, v.1. p.26-51.

3. DOBBS, C. G. & HINSON, W. H. A widespread fungistasis in soils. Nature, London, 172:197-199, 1953.
4. GARRET, S. D. Soil fungi and soil fertility. Oxford, Pergamon Press, 1976, 165p.
5. LOCKWOOD, J. L. Soil fungistasis. Annu. Rev. Phytopathol.; Palo Alto, 2:341-362, 1964.
6. ODUM, E. P. Fundamentos da ecologia (Trad.: C. M. Baeta Neves) 2ª.ed.. Lisboa. Fund. Colouste Gulbenkian. 1976. 595p.
7. PAPAIVIZAS, G. C. & KOVACS, M. F. Stimulation of spore germination of *Thielaviopsis basicola* by fatty acids from rhizosphere soil. Phytopathology, St. Paul, 62:688-694, 1972.

A RIZOSFERA

Elke J.B.N. Cardoso⁽¹⁾ & Sueli S. Freitas⁽²⁾

INTRODUÇÃO

Em 1904, Hiltner (33), um pesquisador alemão, usou pela primeira vez o termo "rizosfera", definindo-o como a região do solo sob influência das raízes. O solo rizosférico tem características bem diferentes das do solo distante das raízes. Assim, num solo em pousio, os microrganismos dependem da incorporação de matéria orgânica como fonte de energia para seu desenvolvimento. Já na rizosfera há maior concentração de nutrientes orgânicos provindos das raízes, que favorecem, e muito, o crescimento de microrganismos (Figura 1); todavia, em solos argilosos essa influência se limita a cerca de 2 mm em torno das raízes (49), podendo ser mais abrangente em solos arenosos ou desérticos. O tamanho da rizosfera também é função da morfologia da raiz.

De maneira geral, o número de microrganismos na rizosfera (R) é muito maior que o de microrganismos no solo não-rizosférico (S) (34; 64), resultando, em outras palavras, que, geralmente, a relação R:S é maior que 1. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Rouatt et al. (58), em que os autores apresentam, para bactérias, fungos e actinomicetos, relações R:S de, respectivamente, 23:1, 12:1 e 7:1.

NUTRIENTES ORGÂNICOS DA RIZOSFERA

As maiores fontes de carbono e nitrogênio para os microrganismos rizosféricos são, de modo geral, as células que se descamam das raízes e os

⁽¹⁾ Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/USP - Caixa Postal 9 - CEP 13400 - Piracicaba/SP.

⁽²⁾ Seção de Microbiologia do Solo - IAC - Campinas/SP.

exsudatos radiculares solúveis (26). Verificou-se que, em cada período de vegetação de milho, chegam ao solo 1.250 m³ de exsudatos radiculares por hectare (28).

As raízes consistem de um meristema apical que produz células da coifa, na direção do ápice, e células que se tornam o verdadeiro "corpo" da raiz.

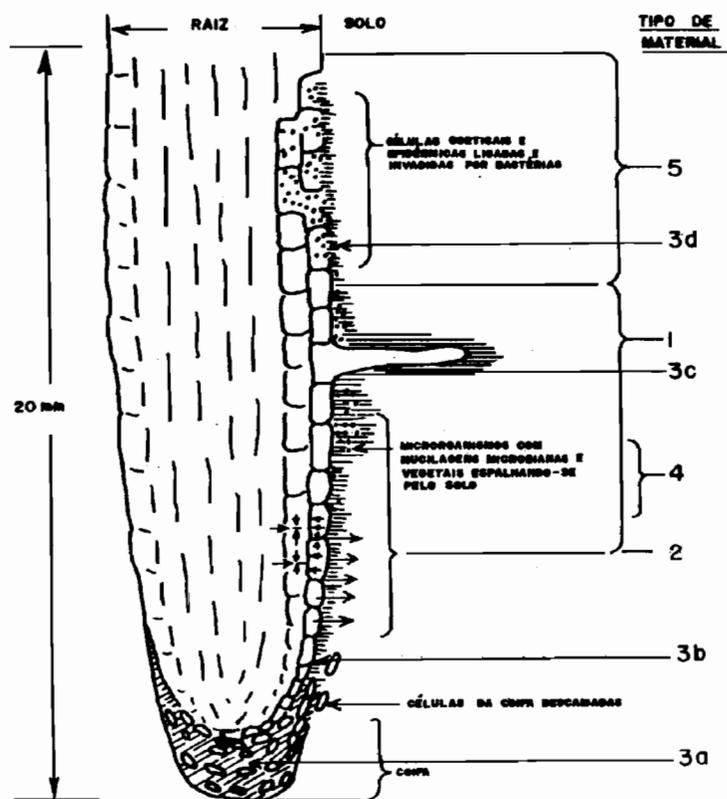


Figura 1. Diagrama de uma raiz mostrando as origens do material orgânico na rizosfera (seg. Rovira et al., 1979 (61): 1) exsudatos; 2) secreções; 3) mucilagens: a) secretadas pelos corpúsculos de Golgi, na coifa; b) hidrolisados de polissacarídeos da parede celular primária entre as células epidérmicas e células da coifa descamadas; c) secretadas pelas células epidérmicas que ainda têm somente paredes primárias (inclui mucilagem secretada através dos pêlos radiculares); d) mucilagem produzida pela degradação bacteriana da parede externa de células mortas da epiderme; 4) mucigel; 5) lisados. Reimpressão da figura 1, Rovira et al. (61), com permissão da Academic Press.

Estas últimas diferenciam-se em cilindro central, córtex e epiderme. As células da coifa descamam-se continuamente, num processo que é muito importante na manutenção do efeito rizosférico. O cilindro central compreende os elementos vasculares, o periciclo e a endoderme. A endoderme é uma camada compacta de células, com partes suberizadas e/ou lignificadas, constituindo proteção contra alguns fitopatógenos. Fungos micorrízicos não a penetram, restringindo sua colonização à região do córtex (Capítulos 19, 20 e 21).

Os pêlos radiculares, com paredes finas e muito numerosos, cumprem função de absorção de água e nutrientes. Funcionam somente por alguns dias ou semanas e depois são rapidamente colonizados por microrganismos. A penetração de *Rhizobium* normalmente se dá através dos pêlos radiculares (Capítulo 9).

As mais variadas substâncias são liberadas pelas raízes (Quadro 1), dividindo-se em exsudatos e lisados radiculares, mucigel, resíduos de paredes celulares e células vegetais intactas (47). A quantidade de exsudatos e lisados radiculares (47) e a espessura da camada de mucilagem ou mucigel (48) são menores em condições estéreis. Aliás, graças à microscopia eletrônica, sabe-se que apenas cerca de 5 a 10% da superfície radicular são habitados.

Quadro 1. Principais componentes detectados em exsudatos de raízes de diferentes plantas (Curl & True-love (15))

| Espécie de composto | Compostos de exsudatos |
|------------------------------------|--|
| Açúcares | Glucose, frutose, sacarose, maltose, galactose, ramnose, ribose, xilose, arabinose, rafinose, oligossacarídeo |
| Compostos aminados | Asparagina, α-alanina, glutamina, ácido aspártico, leucina/isoleucina, serina, ácido aminobutírico, glicina, cistina/cisteína, metionina, fenilalanina, triosina, treonina, lisina, prolina, triptofano, β-alanina, arginina, homoserina, cistationina |
| Ácidos orgânicos | Tartárico, oxálico, cítrico, málico, acético, propiônico, butírico, succínico, fumárico, glicólico, valérico, malônico |
| Ácidos graxos e esteróis | Palmítico, esteárico, oléico, linoléico, colesterol, campesterol, estigmaesterol, sitosterol |
| Fatores de crescimento | Biotina, tiamina, niacina, pantotenato, colina, inositol, piridoxina, ácido p-amino-benzóico, ácido n-metil nicotínico |
| Nucleotídeos, flavononas e enzimas | Flavonona, adenina, guanina, uridina/citidina, fosfatase, invertase, amilase, protease, poligalacturonase |
| Compostos miscelâneos | Auxinas, escopoletina, substâncias fluorescentes, ácido hidrociânico, glicosídeos, saponina, compostos orgânicos de fósforo, fatores de encimamento ou eclosão de nematóides, atraentes de nematóides, estimulantes do crescimento micelial de fungos, inibidores do crescimento micelial, atraentes de zoósporos, estimulantes e inibidores da germinação de esporos e esclerócios, estimulantes e inibidores bacterianos, estimulantes da germinação de ervas daninhas |

Há inúmeros fatores, além da presença de microrganismos, que afetam a exsudação radicular. O principal deles é a injúria (2), sendo que até mesmo a abrasão causada pelas partículas do solo durante o crescimento das raízes estimula a exsudação. Praticamente tudo o que afeta o crescimento vegetal, de forma negativa ou positiva, afeta a exsudação de substâncias orgânicas pelas raízes. Assim, a quantidade e a qualidade dos exsudatos são afetadas pela luz (56; 60), alterando-se inclusive a susceptibilidade das plantas a patógenos (30), pela temperatura (29), pela oxigenação (37) e umidade do solo (15). Em qualquer dos casos, sempre que as raízes forem submetidas a tal estresse em que ocorra morte de algumas delas, poderão ser liberados produtos originários da autólise das células mortas, o que não se constituirá em verdadeira exsudação. Na falta de oxigênio e presença de exsudatos radiculares, ocorre desnitrificação, que é favorecida em anaerobiose (24).

Também a espécie e a idade da planta afetam a exsudação em quantidade e qualidade. Por exemplo, leguminosas são as plantas que maior estímulo causam à rizosfera (25), já se tendo encontrado maior número de bactérias em rizosfera de trevo vermelho que de gramíneas (57).

A exsudação de compostos orgânicos pelas raízes é maior logo no início do crescimento das plantas (59; 60), ocorrendo intensamente assim que as sementes se embebem em água (29). Parkinson et al. (55) observaram que raízes jovens são colonizadas inicialmente por um grupo variado de fungos do solo, os quais, depois de alguns dias, são substituídos por uma microbiota mais restrita, que permanece a mesma até a senescência das raízes. Essas observações estão de acordo com as de Starkey (64), bem mais antigas, segundo as quais o efeito rizosférico atingiria o clímax na época da floração e frutificação, para declinar posteriormente, com a senescência das raízes.

O valor de pH rizosférico é alterado de maneiras variáveis. Dependendo das formas iônicas absorvidas pelas raízes, se cátions ou ânions, será excretado HCO_3^- ou H^+ , para preservar a neutralidade elétrica (27).

De maneira geral e considerando-se que o nitrogênio seja absorvido como nitrato, as plantas absorvem mais ânions do que cátions do solo, resultando em maior excreção de HCO_3^- e em valores mais altos de pH na rizosfera que no solo circunjacente (52). Já se observaram, entretanto, valores de pH rizosféricos 2,4 unidades menores que no solo não rizosférico (32). Valores de pH podem influenciar grandemente a comunidade microbiana rizosférica, tanto de forma direta como indireta, pela alteração nos padrões de exsudação radicular; além disso, se o valor de pH for muito baixo, pode injuriar as raízes (38).

Na rizosfera também pode ocorrer intemperização do material do solo, alterando-se a sua composição mineralógica (62).

EFEITO DA RIZOSFERA NA MICROBIOTA DO SOLO

Quase todos os grupos de microrganismos são afetados pela rizosfera, direta ou indiretamente.

Entre as bactérias, as gram-negativas são mais favorecidas que as gram-positivas e as formas não esporuladas mais do que as esporuladas. Três gêneros são predominantes: *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Agrobacterium* (18), sendo que essa predominância poderia ser explicada pela maior taxa de multiplicação ou menor tempo de geração. Foi verificado que, para *Pseudomonas*, na rizosfera este valor era de 5,2 horas, enquanto que, para *Bacillus*, era de 39 horas. As mesmas bactérias, no solo, apresentam tempos de geração de 77 e 100 horas respectivamente.

Outros fatores de predominância podem ser a capacidade de produzir substâncias inibidoras, como acontece em *Pseudomonas*, ou, ainda, estas sobressaírem pela maior facilidade de identificação. As bactérias anaeróbias também são estimuladas na rizosfera, devido às baixas tensões de O_2 resultantes da intensa atividade respiratória radicular e microbiana (46).

O alto número de bactérias pode estimular a atividade predadora de protozoários. Já se observou que a presença de amebas aumentou a taxa de mineralização de nitrogênio, porque aqueles organismos excretavam substâncias com relação C/N menor que a das bactérias que consumiam (20).

Os fungos, de um modo geral, não são muito afetados pela rizosfera, com relação ao número de propágulos. Entretanto, seria desejável fazer-se uma estimativa da biomassa fúngica na rizosfera em comparação com a do solo. Fungos que apresentam uma interação direta com a raiz, como, por exemplo, fungos micorrízicos e patogênicos, sem dúvida são estimulados e tanto seu crescimento, geralmente filamentosos, quanto fenômenos como quimiotaxia e quimiotrofia positiva dão-lhes vantagens para uma colonização rápida. Qualitativamente, os fungos mais estimulados na rizosfera são *Fusarium* e *Cylindrocarpon*, seguidos por *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Phoma* e *Gliocladium*. Muitos esporos de fungos no solo são comumente dormentes, mas conseguem germinar na rizosfera.

Entre os actinomicetos, os gêneros que predominam na rizosfera são *Nocardia* e *Streptomyces* (25). Em geral, os actinomicetos são menos favorecidos do que as bactérias e os fungos, pois são organismos de crescimento lento e pouco competitivos, não conseguindo dominar em substratos orgânicos nos quais outros microrganismos se instalam mais rapidamente.

As algas, por serem microrganismos fotolitotróficos, dificilmente são favorecidas pela presença de nutrientes orgânicos na rizosfera, o que justifica os baixos valores R:S normalmente encontrados para estes organismos.

A RIZOSFERA E A NUTRIÇÃO VEGETAL

Para serem absorvidos pelas raízes os nutrientes devem atravessar a rizosfera, uma vez que se movem do solo para as raízes, por difusão e fluxo de massa. A taxa de absorção de nutrientes pela planta depende da demanda imposta pelas raízes ao solo na superfície radicular, do tamanho do sistema radicular e da mobilidade do nutriente no solo (53). Assim, a zona de depleção de nutrientes em torno das raízes varia para cada íon considerado.

É natural, pois, que os microrganismos também tenham influência sobre a nutrição vegetal, além do já comentado processo de desnitrificação. A mineralização de todos os nutrientes, como, por exemplo, o nitrogênio e o fósforo, pode ser estimulada na rizosfera. Outras maneiras pelas quais os microrganismos afetam a nutrição mineral das plantas são a imobilização microbiana de N e de P e a dissolução de fosfatos insolúveis (1) (Capítulos 8, 17 e 18).

Quando se trata da nutrição fosfática de plantas, é impossível esquecer-se das micorrizas. Os fungos micorrízicos invadem a região cortical da raiz e apresentam longas hifas externas que se estendem por grande volume do solo, servindo como ampliadores do sistema radicular, absorvendo e translocando, para a planta, os íons fosfato e outros íons de baixa mobilidade que se encontram fora do alcance da raiz (11,44,50) (ver capítulos 19, 20 e 21).

Outro mecanismo que já pôde ser demonstrado é aquele em que determinadas bactérias retêm certos nutrientes em suas gomas ou cápsulas extracelulares (até 20 vezes a quantidade absorvida pelas células), resultando na prevenção da entrada livre do elemento nas raízes (15).

Finalmente, determinados microrganismos podem afetar a morfologia da raiz, com isso influenciando a absorção de nutrientes. Há relatos de efeitos de encurtamentos da raiz e falta de desenvolvimento de pêlos radiculares em resposta à exposição a suspensões microbianas pesadas. Entretanto, também já foi observada a formação de "raízes proteóides", que são densos aglomerados de raízes, os quais só aparecem em solos naturais não-esterilizados e teriam uma maior capacidade absorptiva (15).

ECOFISIOLOGIA DA RIZOSFERA

Embora se tenham muitas informações precisas sobre a morfologia da parte aérea dos vegetais, nosso conhecimento da morfologia das raízes ainda é extremamente rudimentar e seu estudo sistemático é difícil por ser inacessível à observação direta (13). E, se sabemos tão pouco a respeito da própria morfologia radicular, há de se convir que muito menos ainda sabemos sobre as interações complexas que ocorrem entre as raízes e seu ambiente físico, químico e biológico,

especialmente com relação à microbiota da rizosfera, onde vamos encontrar maior concentração e atividade dos microrganismos do solo. É nesse microcosmo palpitante de vida que se desenrolam constante e concomitantemente os mais variados e complexos fenômenos resultantes da atividade fisiológica de inúmeros seres vivos e da ação de uns sobre os outros.

As interações ecofisiológicas que podem ocorrer a nível de rizosfera podem ser assim divididas:

1. interações raiz - solo (fatores físicos e químicos);
2. interações entre raízes de diferentes populações numa comunidade vegetal;
3. interações entre os microrganismos e a vegetação;
4. interações microbiota - solo;
5. interações de populações microbianas entre si;
6. interações com comunidades de animais.

Aquilo que observamos como crescimento ou produção vegetal é resultado da soma de todos esses fatores e interações, favorecendo ou prejudicando a plena expressão do potencial genético da planta.

Devido a essa grande complexidade, aliada à dificuldade metodológica nessa região subterrânea, os estudos sincológicos da rizosfera, isto é, estudos que abrangem todo o ecossistema ao mesmo tempo, são quase impossíveis e de difícil interpretação. Lança-se mão, por isso, de estudos autecológicos, com populações isoladas, para se obterem informações sobre alguns aspectos de interações simples. Contudo, à medida que tais conhecimentos são adquiridos, torna-se obrigatória a sua verificação em condições naturais, sob a influência conjunta de inúmeros fatores modificadores.

No presente capítulo iremos abordar alguns aspectos de interações dos grupos 3 e 5, fazendo menção dos outros somente em alguns casos que auxiliem na interpretação de fenômenos microbiológicos.

INTERAÇÕES ENTRE A MICROBIOTA E A VEGETAÇÃO

Da mesma forma como a parte aérea das plantas evoluiu concomitantemente a uma fauna polinizadora, predadora ou dispersora de sementes e a uma microbiota simbiótica e parasítica, ocorreu uma seleção natural dos microrganismos mais adaptados para se multiplicarem e reproduzirem em rizosferas e/ou raízes de diferentes plantas.

A presença de nutrientes orgânicos exsudados por raízes (aproximadamente 20% da biomassa total das plantas) proporciona nichos atrativos para a maioria dos microrganismos quimiorganotróficos oportunistas que podem explorá-los (59). Esses nichos são seletivos, de tal forma que apenas um número limitado de espécies microbianas predomina num determinado substrato, num certo momento. As interações raiz-microrganismos podem ocorrer em vários níveis: desde associações puramente comensais, passando pelas associações proto-cooperativas e amensalísticas, até às verdadeiras simbioses (antagônicas ou não).

Em alguns casos, um saprófita é meramente beneficiado pela presença dos exsudatos radiculares. Com frequência, porém, microrganismos rizosféricos produzem substâncias que agem diretamente na permeabilidade da membrana celular da raiz, induzindo uma maior exsudação. Outros, ainda, liberam compostos análogos a hormônios vegetais, vitaminas ou toxinas, que podem ser absorvidos e translocados pelas plantas, influenciando o seu desenvolvimento. Entre estes, encontram-se as assim chamadas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (9). Nesse grupo, os gêneros que mais se destacam são *Pseudomonas* (especialmente *P. fluorescens* e *P. putida* que se enquadram entre os mais ativos colonizadores da rizosfera e do rizopiano), *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, etc.. Entretanto, mesmo entre isolados de *Pseudomonas* spp. de rizosfera podem ser encontrados alguns que produzem substâncias tóxicas que deprimem o crescimento vegetal (65). Estes casos podem ser enquadrados sob a denominação de alelopatia, fenômeno bastante conhecido na interação de diferentes espécies de plantas. Aqui também devem ser mencionados alguns microrganismos necrotróficos, ou seja, aqueles que produzem toxinas não-específicas ou enzimas degradadoras as quais destroem o tecido vegetal antes da colonização. A fisiologia desses microrganismos necrotróficos, embora sejam patogênicos, é semelhante à de saprófitas, uma vez que não apresentam as características de parasitas; distinguem-se, ainda, por baixa especificidade para hospedeiros. Alguns patógenos de vegetais, como as *Erwinias* da podridão mole, algumas *Pseudomonas* ou o fungo *Sclerotium rolfsii* podem aqui ser incluídos.

Na rizosfera de determinadas plantas também parece ocorrer uma seletividade favorável a alguns tipos de bactérias fixadoras de nitrogênio. Assim, a rizosfera e o rizopiano de *Paspalum notatum* são, via de regra, colonizados extensivamente pela bactéria *Azotobacter paspali* (17). A associação de *Azospirillum* com raízes de certas gramíneas (cereais e forrageiras) também já vem sendo bastante estudada. Neste caso, os parceiros vivem lado a lado sem a formação de estruturas especiais. Entretanto, acredita-se que haja uma troca de metabólitos entre as raízes e as bactérias (54), ainda que não se conheça, até agora, o suficiente sobre a genética de *Azospirillum* para fazer qualquer afirmação categórica acerca da maior ou menor interação com a planta. Se considerarmos os simples saprófitas comensais como os mais primitivos na escala evolutiva, passaremos por diversos graus de maior ou menor interação, até chegarmos ao parasitismo verdadeiro, que

se caracteriza pelo uso direto de nutrientes não excretados por células vivas. O parasita pode ser definido como aquele que consegue superar as barreiras físicas da planta e inativar ou evitar os mecanismos de defesa pré-existentes e induzidos. Mesmo dentre os parasitas, podemos reconhecer vários estágios evolutivos, desde os parasitas fracos e ocasionais até os parasitas obrigatórios, os quais apresentam um contato íntimo com as células do hospedeiro e são normalmente muito específicos.

Assim, hoje em dia, em microrganismos fitopatogênicos, sabe-se que há quatro tipos de genes, que normalmente não são encontrados em saprófitas, cuja função distingue os parasitas dos saprófitas (23). Estes genes seriam os de parasitismo (permitem a colonização de plantas vivas); de expressão de sintomas; de amplitude de hospedeiros; e de avirulência ou especificidade racial. Já em 1946, Flor (21) propôs o mecanismo da relação gene-para-gene entre hospedeiros e patógenos.

E o que seriam os simbioses de vegetais, senão parasitas extremamente refinados, aqueles que chegaram a tal grau de evolução, que, embora parasitando a planta, não lhe causam danos mas benefícios? (16)

Mencionemos o caso de *Rhizobium* e de *Bradyrhizobium*, bactérias simbioses de leguminosas que induzem a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em seus hospedeiros. Se não houver expressão dos genes responsáveis pela fixação propriamente dita, essas bactérias não passam de simples parasitas que debilitam seus hospedeiros através do desvio de energia. Os mecanismos genéticos complementares nas plantas e nessas bactérias, que possibilitam a seqüência das várias etapas de pré-infecção, colonização, nodulação e função nodular, já são razoavelmente bem conhecidos (Quadro 2). É interessante constatar que vários genes requeridos para parasitismo e amplitude de hospedeiros em *Rhizobium* são similares àqueles presentes em *Agrobacterium*, uma bactéria patogênica em plantas e classificada na família *Rhizobiaceae*, juntamente com os rizóbios.

Outro exemplo que ilustra uma simbiose muito significativa para a grande maioria das plantas é a micorriza. Neste caso, os estudos em sua maioria ainda se restringem a aspectos gerais do efeito da micorriza na planta. Ainda há grande deficiência de informações sobre a ecofisiologia da interação raiz-fungo micorrízico e um total desconhecimento dos genes que governam os processos de reconhecimento, infecção e colonização da raiz, bem como da manutenção e eficiência absorptiva da micorriza. Entretanto, mesmo neste caso, observam-se aspectos característicos da co-evolução entre os sistemas radiculares e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. Assim, de uma maneira geral, as plantas que apresentam raízes de maiores diâmetros, pouco ramificadas e com pelos absorventes escassos, são mais micotróficas (i.e., dependentes da micorriza), do que aquelas cujos sistemas radiculares são mais extensos, abundantemente ramificados ou fasciculados e/ou que produzem pelos radiculares longos e abundantes

(7, 14). Isto demonstra que as estratégias adaptativas usadas por diferentes espécies vegetais são profundamente influenciadas pelas interações com microrganismos.

Em habitats florestais em geral, apenas 10 a 20% da biomassa vegetal está abaixo do solo; já em savanas áridas ou nos nossos cerrados podemos encontrar até 90% de biomassa subterrânea. Embora essas diferenças sejam geneticamente controladas, é interessante notar que tal proporção pode ser afetada pela presença de micorriza. Já se observou diversas vezes que uma mesma planta com micorriza apresenta um sistema radicular proporcionalmente menor do que sem a micorriza (11,31). Isso corresponde a dizer que a micorriza contribui para uma economia de energia da planta que tem que ser utilizada na busca de nutrientes, permitindo a inversão dessa energia na produtividade da biomassa aérea.

Ainda, fungos micorrízicos podem colonizar, ao mesmo tempo, raízes de diferentes plantas que crescem em vizinhança, formando "pontes de hifas" de uma raiz a outra. Através desse mecanismo poderia haver troca de nutrientes, por exemplo, entre gramíneas e leguminosas consorciadas (12,22,36,51).

Sabe-se, ainda, que, em pastos consorciados de gramíneas e leguminosas, freqüentemente o estabelecimento destas últimas é prejudicado, porque suas raízes não conseguem competir na absorção radicular com as de gramíneas.

Quadro 2. Estádios do desenvolvimento nodular e a codificação genética no *Rhizobium* que induz as diferentes fases

| Estádio | Código genético |
|--|-----------------|
| 1. Pré-infecção | |
| a) Colonização da raiz | roc |
| b) Adesão à raiz | roa |
| c) Ramificação de pêlos absorventes | hab |
| d) Enrolamento de pêlos absorventes | hac |
| 2. Infecção e formação de nódulos | |
| e) Infecção da raiz | inf |
| f) Iniciação nodular | noi |
| g) Liberação das bactérias do cordão de infecção | bar |
| h) Desenvolvimento de bacteróides | bad |
| 3. Função nodular | |
| i) Fixação (redução de N_2 a NH_4^+) | nif |
| j) Funções complementares | cof |
| k) Persistência da função nodular | nop |

Entretanto, havendo a simbiose dupla da leguminosa com estirpes eficientes de *Rhizobium* e de fungo micorrízico, essa desvantagem desaparece, tornando ambas as populações vegetais parceiros equivalentes de uma comunidade (4,6).

INTERAÇÕES DE POPULAÇÕES MICROBIANAS ENTRE SI

Além das interações diretas da microbiota rizosférica com a raiz, algumas das quais foram mencionadas acima, também ocorre uma interação direta ou indireta (através da raiz) entre diferentes populações da comunidade microbiana. Assim, os mecanismos de competição e de amensalismo microbianos são muito explorados nos programas de controle biológico de fitopatógenos do solo. Através da modificação de certos parâmetros ambientes (incorporação de vários tipos de matéria orgânica, calagem, acidificação, adubação mineral com determinados compostos, irrigação, drenagem, etc.), podem ser criadas condições que favoreçam microrganismos antagonísticos a diferentes patógenos. A inoculação de sementes ou a infestação do solo com microrganismos antagonísticos também podem resultar num controle eficiente, desde que o habitat rizosférico permita seu estabelecimento e manutenção. Pode, ainda, ocorrer o caso de variedades de plantas que são resistentes a certas doenças por meio da modificação genética de seus exsudatos radiculares, tornando-os impróprios ao desenvolvimento dos patógenos em questão (10,45,66).

Obviamente, os fenômenos de antagonismo não se restringem aos patógenos. Como exemplo, observa-se que *Rhizobium* está sujeito a tais ações durante o processo de sua multiplicação na rizosfera da planta hospedeira. Já se observou nodulação deficiente de leguminosas devido a baixo potencial de inóculo de *Rhizobium*, causado pelo parasitismo de bacteriófagos ou de *Bdellovibrio*, pela predação de protozoários ou pela produção de antibióticos por actinomicetos, cujas populações se multiplicaram intensivamente após a calagem do solo (ver capítulos 15 e 16).

Por outro lado, interações positivas e sinérgicas, conhecidas pelos nomes de comensalismo, protocooperação ou mutualismo são também de ocorrência freqüente na rizosfera. Geralmente, as espécies bacterianas auxotróficas para vitaminas (43) que se estabelecem em rizosferas, fazem-no como comensais de outras espécies, produtoras dessas vitaminas. Certas bactérias, tais como *Pseudomonas* ou *Rhizobium*, propiciam a infecção e colonização de raízes por fungos micorrízicos vesículo-arbusculares, provavelmente através de sua atuação direta na raiz, excretando substâncias que modificam a permeabilidade da membrana celular (5). A germinação de esporos de fungos micorrízicos-VA e o crescimento dos tubos germinativos podem ser favorecidos pela presença de outros microrganismos (3).

APLICAÇÕES FUTURAS

Embora se tenham dado apenas algumas pinceladas em aspectos relevantes da ecofisiologia da rizosfera, parece oportuno apontar que as fronteiras do conhecimento estão avançando rapidamente nesse campo interdisciplinar. As perspectivas para o futuro são promissoras do ponto de vista biotecnológico.

Já sabemos que é possível alterar qualitativamente a microbiota rizosférica, desde que feito com rizobactérias, sendo que as promotoras do crescimento vegetal podem agir através de vários mecanismos, ou seja: a) antibiose pela excreção de antibióticos; b) por meio da produção de sideróforos que quelam o ferro e, através disso, inibem o crescimento de certos componentes da microbiota, incluindo patógenos; c) pela produção de substâncias análogas a auxinas ou citoquininas; e d) pela solubilização de fosfatos (8,19,35,39,40,41,42).

Na literatura, podem ser encontrados diversos relatos de solos condutivos a determinadas doenças, os quais se tornaram supressivos após a inoculação de rizobactérias selecionadas ou através de práticas que favoreciam a colonização de raízes por tais bactérias (63).

Maiores informações sobre as propriedades e a constituição genética desses colonizadores radiculares levarão ao desenvolvimento de inoculantes microbianos de baixo custo. A consideração de aspectos biotecnológicos, tais como alta concentração e eficiência, aliados a um longo período de armazenamento e facilidade de aplicação, poderia resultar em inoculantes de efeito revolucionário na agricultura.

Para alcançar essa meta, bem como manipular outros aspectos da microbiologia da rizosfera, é preciso que ocorra também uma interação simbiótica entre microbiologistas do solo, fitopatologistas, fisiologistas e nutricionistas de plantas, bioquímicos e geneticistas.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York, John Wiley, 2. ed., 1977. 472p.
2. AYERS, W.A. & THORNTON, R.H. Exudation of amino acids by intact and damaged roots of wheat and peas. *Pl. Soil*, Hague, 28:193-207, 1968.
3. AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J.M. Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 84:536-537, 1985.
4. AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M.; AZCON, R. & DIAZ-RODRIGUEZ, R.M. Time course of N₂-fixation (¹⁵N) in the field by clover growing alone or in mixture with

ryegrass to improve pasture productivity, and inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, Oxford, 112:399-404, 1989.

5. BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Adv. Agron.*, New York, 36:1-54, 1983.
6. BAREA, J.M.; AZCÓN, R. & AZCÓN-AGUILAR, C. Estimation of N₂-fixation by clover and N-transfer from clover to ryegrass by using ¹⁵N in a time-course experiment under field conditions and study of some related mycorrhizal implications. *New Phytol.*, Oxford, 1988. (no prelo).
7. BAYLIS, G.T.S. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*, London, Academic Press. 1975. p.373-390.
8. BROWN, M.E.; JACKSON, R.M. & BURLINGHAM, S.K. Effects produced on tomato plants, *Lycopersicon esculentum*, by seed and root treatment with gibberellic acid and indolyl-3-acetic acid. *J. Exp. Bot.*, London, 19:544-552, 1968.
9. BURR, T.J. & CAESAR, A. Beneficial Plant Bacteria. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, Boca Raton, 2(1):1-20, 1985.
10. CARDOSO, E.J.B.N. Contribuição ao estudo do controle biológico da murcha de *Fusarium oxysporum* & *phaseoli* (Schelecht) Kendr. & Snyd. em *Phaseolus vulgaris* L. Piracicaba, SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1968. 58p. (Dissertação de Mestrado).
11. CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja - *Rhizobium*. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 9:125-130, 1985.
12. CHIARIELLO, N.; HICKMAN, J.C. & MOONEY, H.A. Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants. *Science*, Washington, 2/7:941-943, 1982.
13. CODY, M.L. Roots in Plant Ecology. *Tree*, 1:76-78, 1986.
14. CRUSH, J.P. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytol.*, Oxford, 73:743-749, 1974.
15. CURL, E.A. & TRUELOVE, B. The rhizosphere. Berlin, Springer-Verlag, 1985. 288p.
16. DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W. & ROLFE, B.G. *Rhizobium* - the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 25:145-68, 1987.
17. D'OBBEREINER, J. & DAY, J.M. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: STEWART, W.D.P. ed. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1975. p.39-55
18. DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. *Écologie microbienne du sol*. Paris, Masson et Cie, ed., 1970. 796p.

19. EKLUND, E. Secondary effects of some pseudomonads in the rhizoplane of peat grown cucumber plants. *Acta Agric. Scand., Estocolmo*, 17:1-57, 1970.
20. ELLIOTT, E.T. & COLEMAN, D.C.; COLE, C.V. The influence of amoebae on the uptake of nitrogen by plants in gnotobiotic soil. In: HARLEY, J.L. e R.S. RUSSEL eds. *The soil-root interface*. New York, Academic Press, 1979. p.221.
21. FLOR, H.H. Genetics of pathogenicity in *Melospora lini*. *J. Agric. Res., Washington*, 73:335-57, 1946.
22. FRANCIS, R.; FINLAY, R.D. & READ, D.J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in intra-specific combinations of host plants. *New Phytol., Oxford*, 102:103-111, 1986.
23. GABRIEL, D.W. Specificity and gene function in plant - pathogen interactions. *Am. Soc. Microbiol. News, Washington*, 52:19-25, 1986.
24. GARCIA, J.L. Effet rhizosphere du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 7:139-141, 1975.
25. GRAY, T.R.G. & WILLIAMS, S.T. *Soil micro-organisms*. Edinburgh, Oliver & Boyd, 1971. 240 p.
26. GRIFFIN, G.J.; HALE, M.G. & SHAY, F.J. Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 8:29-32, 1976.
27. GRINSTED, M.J.; HEDLEY, M.J.; WHITE, R.E. & NYE, P.H. Plant induced changes in the rhizosphere of rapeseedlings. pH change and the increase in P concentration in the soil solution. *New Phytol., Oxford*, 91:19-29, 1982.
28. GUCKERT, A.; BREISCH, H. & REISINGER, O. Interface sol-racine. I. Étude ou microscope eletronique des relations mucigel - argile - microorganismes. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 7:241-250, 1975.
29. HALE, M.G. & MOORE, L.D. Factors affecting root exudations. II. 1970-1978. *Adv. Agron., New York*, 31:93-124, 1979.
30. HARLEY, J.L. & WAID, J.S. The effect of light upon the roots of beech and its surface population. *Pl. Soil, Hague*, 7:96-112, 1955.
31. HAYMAN, D.S. & MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Growth of *Endogone* - inoculated plants in phosphate deficient soils. *New Phytol., Oxford*, 70:19-27, 1971.
32. HEDLEY, M.J.; NYE & P.H.; WHITE, R.E. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. II. Origin of the pH change. *New Phytol., Oxford*, 91:31-44, 1982.

33. HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Deut. Landwirtsch. Ges.*, 98:59-78, 1904.
34. KATZNELSON, H. & ROUATT, J.W. Manometric studies on rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Can. J. Microbiol., Ottawa*, 3(5):673-678, 1957.
35. KAVIMANDAN, S.K. & GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. on phosphate uptake and yield in maize. *Curr. Sci., Bangalore*, 40:439-440, 1971.
36. KESSEL, C. van; SINGLETON, P.W. & HOBEN, H.J. Enhanced N-transfer from a soybean to maize by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. *Plant Physiol., Bethesda*, 79:562-563, 1985.
37. KIRKHAM, M.B. Soil-oxygen and plant-root interaction: an electrical analog study. *Pl. Soil, Hague*, 100(1-3):11-19, 1987.
38. KIRLEW, P.W. & BOULDIN, D.R. Chemical properties of the rhizosphere in an acid subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. J., Madison*, 51(1):128-132, 1987.
39. KLOEPPER, J.W. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology., St Paul*, 73:217-219, 1983.
40. KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZ, M. & SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature, London*, 286:885-886, 1980a.
41. KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZ, M. & SCHROTH, M.N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease supressive soils. *Curr. Microbiol., New York*, 4:317-320, 1980b.
42. KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology, St Paul*, 71:1020-1024, 1981.
43. LOCHHEAD, A.G. & CHASE, F.E. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutricional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Sci., Baltimore*, 55:185-195, 1943.
44. LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.L.L. & MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares. *R. bras. Ci. Solo., Campinas*, 7:137-141, 1983.
45. LYDA, S.D. Alleviating Pathogen Stress. In: ARKIN, G.F. & TAYLOR, H.M. eds. *Modifying the root environment to reduce crop stress*. Am. Soc. Agricult. Engineers, Michigan, 1981. p.195-216.
46. LYNCH, J.M. Interactions between bacteria and plants in the root environment. In: RHODES - ROBERTS, M. & SKINNER, F.A. eds. *Bacteria and Plants*. New York, Academic Press, 1982. p. 123.

47. MARTIN, J.K. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem*, Oxford, 9:1-7, 1977.
48. McLAREN, A.D. Contribution to a discussion on the root region of plants. In: GRAY, T.R.G. & D. PARKINSON eds. *The ecology of soil bacteria*. Liverpool, Liverpool University Press, 1968. p. 434.
49. MERCKX, R.; VANGINKEL, J.; SINNAEVE, J. & CREMERS, A. Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. I. Production and turnover of root-derived material in the rhizosphere of maize and wheat. *Pl. Soil*, Hague, 96(1):85-94, 1986.
50. MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annu. Rev. Phytopathol.*, St. Paul, 11:171-196, 1973.
51. NEWMAN, E.I. & RITZ, K. Evidence on the pathway of phosphorus transfer between vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.*, Oxford, 104:77-87, 1986.
52. NYE, P.H. Processes in the root environment. *J. Soil Sci.*, London, 19:205-215, 1968.
53. NYE, P.H. Soil properties controlling the supply of nutrients to root surface. In: HARLEY, J.R. e R.S. RUSSEL eds. *The soil-root interface*. London, Academic Press, p. 39-49, 1979.
54. OKON, Y. Response of cereal and forage grasses to inoculation with N₂-fixing bacteria. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E. eds. *Advances in nitrogen fixation research*. Hague, Nijhoff/Junk, 1984. p. 303-309.
55. PARKINSON, D.; TAYLOR, G.S. & PEARSON, R. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. *Pl. Soil*, Hague, 19:332-349, 1963.
56. ROUATT, J.W. & KATZNELSON, H. Influence of light on bacterial flora of roots. *Nature*, London, 186:659-660, 1960.
57. ROUATT, J.W. & KATZNELSON, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere of crop plants. *J. Appl. Bact.*, London, 24:164-171, 1961.
58. ROUATT, J.W.; KATZNELSON, H. & PAYNE, T.M.B. Statistical evaluation of the rhizosphere effect. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, Madison, 24:271-273, 1960.
59. ROVIRA, A.D. Plant root excretion in relation to the rhizosphere effect. II. A study of the properties of root exudate and its effect on the growth of micro-organisms isolated from rhizosphere and control soil. *Pl. Soil*, Hague, 7:195-208, 1956.
60. ROVIRA, A.D. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, temperature and calcium nutrition on exudation. *Pl. Soil*, Hague, 11:53-64, 1959.
61. ROVIRA, A.D. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: HARLEY, J.L. e R.S. RUSSEL eds. *The soil-root interface*. London, Academic Press, 1979. p. 1-4.

62. SARKAR, A.M.; JENKINS, D.A. & JONES, R.G.W. Modifications to mechanical and mineralogical composition of soil within the rhizosphere. In: HARLEY, J.L. e R.S. RUSSEL eds. *The soil-root interface*. London, Academic Press, 1979. p. 125-136.
63. SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, Washington, 216:1376-1381, 1982.
64. STARKEY, R.L. Some influences of the development of higher plants upon the micro-organisms in the soil. II. Influence of the stage of plant growth upon abundance of organisms. *Soil Sci.*, Baltimore, 27:355-378, 1929.
65. SUSLOW, T.V. & SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, St. Paul, 72:111-115, 1982.
66. TOLEDO, A.C.D. & CARDOSO, E.J.B.N. Efeito da microflora natural e de suplementações do solo no controle biológico do "bakanae" do arroz. *Summa Phytopathol. Piracicaba*, 1:81-86, 1975.

EFEITO DE FATORES DO SOLO

Siu Mui Tsai⁽¹⁾ Amalia V.L. Baraibar⁽²⁾ & Vera L.M. Romani⁽³⁾

EFEITOS DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS SOBRE OS MICRORGANISMOS DO SOLO UMIDADE E AERAÇÃO

A umidade é um dos fatores mais determinantes, regulando a atividade microbiana de várias maneiras: a) como componente do protoplasma celular, sendo por isso um elemento indispensável; b) modificando as trocas gasosas e c) dissolvendo e transportando diferentes nutrientes (1).

O teor de umidade é conhecido em % ou pF (logaritmo da altura da coluna de água em cm, que representa a pressão). Por exemplo, a umidade equivalente, que é ótima para os seres vivos do solo, tem pF de -2,7, podendo esta umidade ser para solos diferentes, equivalente a 20%; 25%, etc. (10).

Contrariamente ao que se pensa, as condições ótimas de desenvolvimento de um microrganismo nem sempre correspondem à umidade ótima detectada a partir de um solo esterilizado e inoculado com o mesmo microrganismo, indicando que vários fatores interagem para fornecer a umidade adequada, sendo que extremos de umidade podem ser prejudiciais à atividade microbiana (5).

A atividade respiratória de um solo, que é medida pela liberação de CO₂, indica a biomassa microbiana desse solo e apresenta um pico máximo

⁽¹⁾ Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

⁽²⁾ Laboratório de Microbiologia y Control de Inoculantes, PLAN Agropecuario, MAP, Boulevard Artigas 3802, Montevideo, Uruguay.

⁽³⁾ Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

numa faixa média de umidade entre 1/100 a 4 bars, ou valores de pF entre 3,0 e 1,0. A umidade ótima para as diferentes atividades metabólicas varia entre os tipos de solo, teor de argila, grupos de microrganismos, vegetação, etc.

Parte da água de um solo é livre ou gravitacional (Figura 1) e se localiza nos poros grandes, influenciando sobremaneira na aeração; parte é retida, adsorvida às partículas, sendo disponível apenas parcialmente para utilização pelos microrganismos.

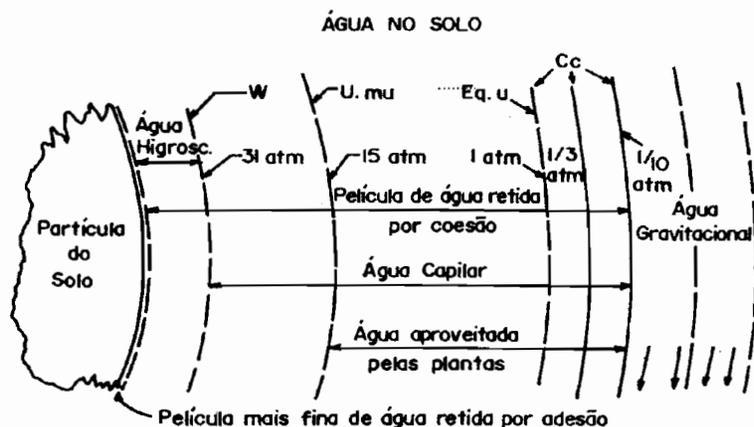


Figura 1. Representação esquemática do espaçamento progressivo da película de água e do declínio correspondente da tensão com que essa água é retida por uma partícula de solo em um macroporo. São representadas, também, a posição da água de adesão, de coesão, higroscópica, capilar, gravitacional e as diversas constantes.

A aeração e a umidade estão inversamente relacionadas, pelo movimento e substituição do ar e da água. A atmosfera do solo difere da atmosfera da superfície, sendo a concentração de CO_2 de 10 a 100 vezes maior na atmosfera do solo, acontecendo, porém, o inverso com o teor de O_2 . Essas diferenças são devidas à respiração dos microrganismos e raízes, que consomem O_2 e eliminam CO_2 . Em geral, o O_2 diminui e o CO_2 aumenta com a profundidade. As alterações na constituição do ar do solo governam o crescimento e atividade da microbiota, pois CO_2 e O_2 são necessários ao crescimento. Um solo bem arejado, do ponto de vista microbiológico, é aquele em que a atividade de oxigenação é máxima. Contudo, é pouco provável que um solo torne-se suficientemente aerado a ponto de satisfazer toda biota, devido à dificuldade de movimentação gasosa nos pequenos poros, baixa difusão de O_2 em meio líquido e microambientes em que os

microrganismos estão situados. Daí, um solo suficientemente aerado para o crescimento vegetal não tem, necessariamente, um ótimo teor de O_2 para a microbiota (4).

Pouca aeração, por outro lado, é consequência de má drenagem e encharcamento. Tendo os poros pequenos maior capacidade de retenção de água que os grandes, os solos pesados são mais sujeitos à má drenagem, havendo mau suprimento de O_2 , redução da velocidade de muitas transformações e inibição completa de alguns processos. Nesse ambiente, novos processos aparecem, alguns prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, como, por exemplo, a liberação de H_2 ou CH_4 , o aparecimento de inibidores orgânicos e acúmulos de íons sulfetos de ferro e manganês (3).

A água do solo contém sais inorgânicos em alta diluição, exceto em zonas áridas, onde podem ocorrer maiores concentrações. Uma concentração adequada de nutrientes é importante para os organismos podendo, através da lixiviação, tornarem-se escassos o nitrogênio, potássio, magnésio, enxofre e cálcio, havendo no entanto, pouco efeito sobre o fósforo e a matéria orgânica. A marcha e a amplitude dessas perdas são reguladas pela precipitação, cobertura vegetal e textura do solo (12).

Num solo hidromórfico, de um modo geral, ocorre um desaparecimento da microbiota composta por fungos e actinomicetos. As cianofícias e bactérias anaeróbias se beneficiam desse ambiente.

A umidade condiciona a atividade celulolítica. Valores de umidade menores que 50 ou 60%, numa alternância de umidade e dessecação, favorecem as formas filamentosas; valores mais altos dão vantagens aos organismos unicelulares. Com uma umidade de 20% ainda aparecem os actinomicetos, com 60%, aparecem espécies unicamente celulolíticas e com 70% aparecem os fungos. Para a atividade lignolítica, de responsabilidade principalmente fúngica, as umidades requeridas são altas (70%) para os agentes de podridão branca.

O pF ótimo para nitrificação se situa entre 1,0 e 2,0, o que indica que esse processo é afetado por fortes umidades que reduzem as trocas gasosas. Existe concordância em aceitar que valores de pF de 1,7 (tensões de 0,05 bars) reduzem sensivelmente a nitrificação.

A amonificação parece ser tolerante no plano da umidade, podendo existir atividade até valores de pF da ordem de 5,4 a 5,6, considerados elevados.

Quanto à mineralização das formas orgânicas dos elementos do solo, esta ocorre preferencialmente com valores de umidade próximas a 0,33 bars, sendo a oxidação favorecida por tensões de 0,03 a 0,06 bars, enquanto que a redução ocorre em condições contrárias, com menor teor de O_2 .

A solubilização de fosfatos se beneficia em condições hidromórficas porque aumentam os teores de ácidos orgânicos, aumentando também a solubili-

zação de fosfatos férricos por resíduos vegetais que são decompostos em anaerobiose. A mineralização do fósforo orgânico é fortemente estimulada pela anaerobiose para alguns tipos de solos, sendo favorecida pela alternância de seca e umidade.

Quando os teores de O_2 no solo são inferiores a 4% e 8%, há indução de processos anaeróbios, principalmente em microssítios onde a difusão gasosa é lenta. Estes valores variam em função do tipo de solo. Teores médios de O_2 favorecem processos como a fixação biológica de nitrogênio, a humificação microaerófila e a imobilização de nitrogênio. Baixas tensões de O_2 , assim como as tensões muito altas (1), diminuem a produção de nitratos.

TEMPERATURA

A temperatura do solo é função da relação entre a quantidade de energia calorífica absorvida e perdida, sendo que o primeiro fator depende da cobertura vegetal, tipo de solo, umidade, etc. A temperatura do solo sofre variações diárias e sazonais, com marcada influência nos horizontes superficiais, portanto, nas regiões de maior atividade microbiana. Desta maneira, várias pesquisas têm demonstrado a existência de uma estreita correlação entre atividade biológica medida pela respiração ou liberação de CO_2 e a temperatura do solo medida "in situ".

O estudo dos efeitos da temperatura na microbiota telúrica deve ser abordado em dois aspectos fundamentais: um referindo-se a temperaturas ótimas, mínimas e máximas, determinando a atividade bioquímica e a taxa de crescimento; o outro referindo-se a temperaturas letais.

Cada espécie microbiana é caracterizada por uma faixa de temperatura ótima de crescimento que permite definir quatro tipos de microrganismos: 1) *Mesófilos*: com temperaturas ótimas entre $25^{\circ}C$ e $40^{\circ}C$, com limites mínimos e máximos de $15^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$, respectivamente. A este grupo pertence a maioria das bactérias, actinomicetos e fungos que vivem no solo. Para estes últimos, a temperatura de crescimento é da ordem de $26^{\circ}C$ e a de esporulação é superior a $30^{\circ}C$. As algas, sendo muito sensíveis às variações de temperatura, variam suas exigências de uma espécie para outra; 2) *Psicrófilos*: onde a temperatura ótima de crescimento é inferior a $20^{\circ}C$, portanto com aptidão de se desenvolver a baixas temperaturas. A máxima não supera temperatura acima de $35^{\circ}C$. Pertencem a este grupo os bastonetes gram-negativos; 3) *Termófilos*: apresentando a taxa de crescimento máximo a $45^{\circ}C$, sendo a mínima da ordem de $35^{\circ}C$ a $40^{\circ}C$. Não são muito abundantes nos solos, dependendo do teor de matéria orgânica. Pertencem a este grupo, os microrganismos que crescem em pilhas de compostagem e; 4) *Termófilos facultativos*: desenvolvem-se bem numa ampla faixa de temperatura, variando desde $28^{\circ}C$ até $56^{\circ}C$ (5).

Quanto aos processos de atividade biológica, a celulólise ocorre em larga amplitude de temperatura, desde $5^{\circ}C$ até $65^{\circ}C$. Nesta última situação se enquadra a atividade anaeróbica de bactérias e alguns actinomicetos e fungos.

A lignólise é um processo predominantemente mesofílico, com a temperatura ótima raramente ultrapassando $30^{\circ}C$. Os agentes da podridão branca preferem temperaturas mais elevadas, com um ótimo nível acima de $35^{\circ}C$, porém, são muito resistentes a baixas temperaturas ($-20^{\circ}C$) e até estimulados pela ação do frio em curtos períodos. Populações termófilas crescendo entre $57^{\circ}C$ e $60^{\circ}C$ seriam as responsáveis pela pequena distribuição da lignina (11%) em poucos meses.

A nitrificação é estimulada por uma elevação conveniente de temperatura, sendo porém, capaz de ocorrer tanto em baixas como em altas temperaturas, embora não existam nitrificadores termófilos. A temperatura de atividade mínima é menor para *Nitrosomonas* do que para *Nitrobacter*, sendo que esta última fica inativa em extremos menores que $5^{\circ}C$ e maiores que $40^{\circ}C$.

Para a desnitrificação, a temperatura ótima é muito elevada, situando-se entre $60^{\circ}C$ e $65^{\circ}C$. Em temperaturas baixas produz-se mais N_2O , enquanto que as altas temperaturas favorecem a redução de N_2O a N_2 .

O efeito da temperatura no rizóbio varia em função da espécie e do sistema fixador, sendo muito complexo em, provavelmente, todos os estádios desde a infecção da bactéria na raiz da planta até o funcionamento dos nódulos.

Os microrganismos envolvidos no ciclo do fósforo, responsáveis pela mineralização do P orgânico, são favorecidos pelas temperaturas altas ($40^{\circ}C$ até $50^{\circ}C$) tanto para regiões tropicais como temperadas. A solubilização de fosfatos naturais não apresenta exigências de temperatura, provavelmente devido ao grande número de espécies microbianas implicadas nesse processo (2).

A mineralização de enxofre orgânico é favorecida por temperaturas que aumentam progressivamente até $35^{\circ}C$, sendo discreta à temperatura inferior a $10^{\circ}C$. A oxidação do S no solo, porém, é muito sensível à baixa temperatura: a $4^{\circ}C$ é quase insignificante enquanto que a $23^{\circ}C$ é muito ativa (16).

pH

O Brasil possui grande parte de sua área representada por solos ácidos, 9 que apresentam geralmente concentrações inadequadas de certos nutrientes ou elementos, resultando em problemas nutricionais para as plantas. O principal efeito da acidez do solo está na concentração de íons hidrogênio, na deficiência de cálcio, fósforo e molibdênio e quantidades excessivas de alumínio e manganês (10).

A inibição do crescimento microbiano em valores de pH considerados desfavoráveis, resulta não só do efeito direto da elevada concentração de H^+ ou OH^- , mas também da influência indireta do pH na penetração nas células microbianas de compostos tóxicos presentes no meio.

A ação do pH sobre os organismos do solo depende de sua tolerância a esse fator. Distinguem-se quatro categorias de organismos segundo Dommergues e Mangenot (5): 1) *Indiferentes*: crescem numa faixa ampla de valores de pH. É o caso de numerosas bactérias que apresentam crescimento satisfatório entre valores de pH 6,0 a 9,0. Para os fungos os valores variam entre pH 2,0 a 8,0; 2) *Neutrófilos*: preferem pH próximo à neutralidade até ligeiramente alcalino. Numerosos actinomicetos não apresentam crescimento em valores de pH inferiores a 5,5. As cianobactérias e diatomáceas preferem ambientes neutros ou um pouco alcalinos, sendo que, com valores de pH menores que 6,0, a atividade tende a desaparecer; 3) *Acidófilos*: são os que preferem ambientes francamente ácidos; 4) *Basófilos*: não suportam valores de pH inferiores a 8,0.

Quanto às atividades bioquímicas de importância no solo, vinculadas aos ciclos de transformação dos elementos, observa-se que a celulólise é mais ativa em solos alcalinos, sendo que o pH do solo exerce uma profunda influência na composição da microbiota celulolítica. As bactérias aeróbias são mais tolerantes à acidez, sendo sua distribuição no solo mais ampla que a das bactérias aeróbias. As micobactérias são as mais sensíveis à acidez e os actinomicetos celulolíticos aparecem nos valores de pH entre 4,6 e 9,5. Os basidiomicetos degradadores do complexo lignocelulósico são, em geral, acidófilos e outros mais ou menos indiferentes. Já a lignólise se desenvolve em condições de pH baixo por ser de responsabilidade eminentemente fúngica.

Nas transformações bioquímicas do nitrogênio no solo, a nitrificação é considerada exigente em valores de pH próximos à neutralidade. Este fato pode explicar o efeito espetacular da calagem, existindo, porém, situações em que espécies nitrificadoras são tolerantes a valores de pH mais baixos, até pH 4,0. A amonificação é muito menos sensível a mudanças do pH, o que se explica pela heterogeneidade dos tipos microbianos que compõem este grupo fisiológico. A tolerância à acidez é responsável pelo acúmulo de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) em solos ácidos onde não ocorre nitrificação. Porém, em solos ácidos, a mineralização do nitrogênio orgânico é mais lenta, porque a microbiota responsável nestas condições está restrita a escassos grupos.

A desnitrificação é favorecida por condições neutrófilas, sendo seu valor ótimo de pH entre 7,0 e 8,6. Existem registros de tolerância à acidez desde 5,0 até um máximo de pH 10,5. Em valores de pH 7,0, o N_2O é pouco abundante, porque é facilmente reduzido a N_2 , fato que não ocorre em valores menores que 6,0, onde a redução de N_2O é fortemente inibida (1).

A microbiota solubilizadora de fósforo é indiferente às mudanças do pH, enquanto que os processos de mineralização se apresentam como mais sensíveis à acidez do solo do que a mineralização do nitrogênio e do carbono da matéria orgânica. Uma elevação do pH do solo induz a uma aceleração do processo oxidativo, sendo que os valores mais favoráveis estão compreendidos entre 6,0 e 7,0 (2).

A oxidação biológica do enxofre tanto como do manganês é favorecida pela neutralidade, observando-se resposta à calagem, quando os valores de pH aumentam de 5,0 até 7,5. Ressalta-se que o *Thiobacillus thiooxidans* tolera valores de pH 1,5 a 2,0. Os processos redutores podem ocorrer em uma larga faixa de pH, indo desde 5,0 até 9,0 e, de um modo geral, outros fatores do solo são mais determinantes que o pH para a sua ocorrência (5).

SALINIDADE E PRESSÃO OSMÓTICA

Quando certos elementos minerais atingem um teor anormalmente elevado no solo, eles inibem parcial ou totalmente a microbiota telúrica (7).

O excesso de sais solúveis afeta milhões de km^2 de terras potencialmente úteis no mundo, e o potencial agrícola dessas terras geralmente não é limitado pela falta de radiação solar ou temperatura, podendo, se bem manejadas, tornarem-se produtivas (13).

As medidas de salinidade do solo são comumente feitas determinando-se a condutividade elétrica (EC) em S/m ou a pressão osmótica equivalente em bars na solução de saturação do solo.

Os solos salinos são classificados em dois grandes grupos: 1) Solos salinos (15% Na, teor em sais 0,4 S/m e pH 8,5); 2) Solos sódicos (15% Na, teor em sais 0,4 S/m e pH entre 8,5 e 10,0) (4).

A complexidade do efeito da salinidade do solo sobre os organismos é tal, que se torna difícil tirar conclusões a partir dos escassos trabalhos publicados nesta área.

De um modo geral, estes solos constituem um meio desfavorável para a maioria dos organismos telúricos em razão da presença dos íons tóxicos, do pH muito elevado, da estrutura compacta e da tensão osmótica muitas vezes elevada.

Os organismos mais sensíveis são os fungos, com exceção dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* que resistem a teores elevados de NaCl de até 10 a 20%. As algas apresentam uma sensibilidade muito variável, sendo que altos teores eliminam a maioria das Diatomáceas e provocam pouco efeito nas cianobactérias do gênero *Anabaena*. A adição em meio livre de nitrogênio de 10 meq/l

de NaCl em cultura de *Azolla mexicana* estimula o crescimento com relação ao controle, sem NaCl. Adições de 50 meq/l promoveram diminuição (14%) na produção de matéria seca, reduzindo o N fixado e o teor deste nutriente na *Azolla*. Sais como KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂SO₄ e MgSO₄ reduzem mais severamente que o NaCl (18).

Nas bactérias, a resistência a altas pressões osmóticas varia consideravelmente de uma espécie para outra e também dentro de uma mesma espécie. *Azotobacter* resiste muito mais à salinidade, inclusive em relação a maioria das plantas cultivadas. Os valores a partir dos quais as bactérias não se multiplicam mais, ou morrem, variam de 2 a 5%, sendo, porém, a capacidade de fixação de N₂ reduzida a valores bem menores que esses limites. A capacidade de fixação de N₂ das estirpes de rizóbio mais tolerantes está limitada a partir de 0.2 a 1.5% (14;15).

A simbiose com *Rhizobium* é afetada de forma deletéria tanto em solos salinos como em solos sódicos, desde a proliferação do rizóbio na rizosfera, à infecção da raiz e ao funcionamento do nódulo. Os estudos dirigidos para estabelecer os efeitos dos sais no crescimento do *Rhizobium* em cultura têm demonstrado que são precisos altos níveis para inibir o crescimento da bactéria em meio de cultura. Comparando-se a sensibilidade da bactéria e da planta, foi demonstrado que as bactérias conseguem sobreviver em níveis salinos inibitórios para o hospedeiro. Não se deve assumir que não existam problemas para a simbiose, uma vez que tem sido constatada diminuição na sobrevivência, sendo a nodulação muito mais sensível às condições de salinidade que o sistema radicular, pelo menos para soja, que demonstrou um grande atraso na nodulação afetando sobremaneira a produção (11).

De todos os processos biológicos, a nitrificação é certamente o mais sensível à influência tóxica da salinidade. Em função do tipo e da natureza dos sais, o limite de toxicidade situa-se ao redor de 0,02% para NaCl; 0,2%, para Na₂CO₃ ou NaHCO₃; e 1%, para Na₂SO₄.

A redução de sulfatos em solos salinos com altos valores de pH é particularmente favorecida, já que esta reação precisa de condições anaeróbicas, além de SO₄²⁻ e matéria orgânica (4).

LUZ

O efeito da luz sobre os microrganismos se exerce diretamente para aqueles presentes na superfície do solo, ou indiretamente, através das plantas, para aqueles que habitam as camadas mais profundas do solo, na região de influência rizosférica ou em simbiose com os as raízes (ver capítulo 4). Estes últimos dependem diretamente dos produtos fotossintetizados que a planta destina à raiz, seja diretamente ou como exsudatos.

As algas, as cianobactérias e as bactérias fotossintetizadoras precisam de luz e CO₂ para se desenvolverem normalmente. A exigência de CO₂ pode ser satisfeita sem dificuldades, porém a luz só é disponível na superfície do solo. Este fato restringe o crescimento desses microrganismos verticalmente até os primeiros 10 ou 15 mm de profundidade de solo (onde os raios de luz ainda podem penetrar), quando vivendo em condições fotolitotróficas.

Para as cianofíceas, a luz é indispensável também para a fixação de N₂. Existem algumas evidências de que, na presença de açúcares, as cianobactérias se desenvolvem no escuro por pouco tempo, porém, nessas condições, elas não fixam N₂.

EFEITO DOS MICRORGANISMOS NAS PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO

A atividade que os microrganismos desempenham nos solos está intimamente relacionada com a própria formação dos solos, sua fertilidade, estrutura e condições de sanidade, através dos processos de redução, oxidação, produção de enzimas e liberação de produtos metabólicos que provocam modificações importantes nas propriedades do solo, tais como o pH, estrutura, temperatura, etc.

MODIFICAÇÕES DO pH

a) Acidificação

Existem processos microbiológicos que são acidificantes como a nitrificação, sulfoxidação e, de menor importância, a produção de ácido carbônico resultante da reação do CO₂, liberado pela respiração, com a água.

O poder tampão do solo, a intensidade de reação de nitrificação e a natureza e a quantidade de substrato amoniacal, são fatores que condicionam a alteração do pH pelo processo de nitrificação. De um modo geral, as alterações se dão a níveis de microssítios, sem serem percebidas nas determinações de pH do solo como um todo (17).

A sulfoxidação libera H₂SO₄ e depende do teor de enxofre reduzido presente no solo, além da produção de H₂CO₃ pela reação do CO₂ com a água. A figura 2 mostra a acidificação resultante da sulfoxidação em um solo alcalino enriquecido com S elemental. Outros microrganismos, principalmente leveduras do gênero *Lipomyces* e várias espécies de *Clostridium*, produzem grandes quantidades de ácidos orgânicos tais como fórmico, acético, butírico, láctico, oxálico e succínico em condições anaeróbicas. Estes ácidos, além de serem agentes acidificantes a nível de rizosfera são muito importantes na solubilização de fosfatos e como agentes complexantes de íons metálicos.

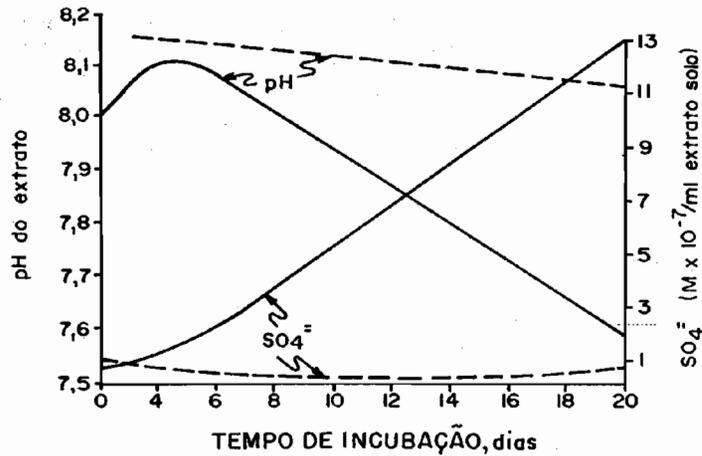


Figura 2. Acidificação resultante da sulfoxidação em um solo alcalino enriquecido com S elemental. As curvas pontilhadas correspondem à testemunha não enriquecida de S.

b) Alcalinização

A alcalinização de origem microbiana ocorre como resultado da incorporação no solo, de compostos nitrogenados orgânicos de baixa C/N como é o caso de uréia, cianamida cálcica, farinha de alfafa, etc. O aumento de pH ocorre devido à acumulação de NH_3 no solo e é mantido em função da quantidade de produto incorporado. Dependendo de que a microbiota nitrificante seja ou não inibida pelo pH elevado e da presença excessiva de NH_3^{3+} , a elevação ocorrida permanecerá por mais tempo. A figura 3 ilustra o fenômeno de alteração de pH de acordo com a adição dos diferentes compostos nitrogenados.

MODIFICAÇÕES NA ATMOSFERA DO SOLO

A atmosfera do solo apresenta variações na sua composição, quando comparada com a atmosfera livre. A intensificação das atividades microbianas, como produto da incorporação de adubos verdes, restos vegetais, etc., promove incrementos na concentração de CO_2 que pode atingir até 30% em volume. Paralelamente, há um consumo de O_2 disponível que, nas situações mais drásticas, conduz à ocorrência de anaerobiose, a qual pode ser agravada, quando acompanhada por outros fatores, como alta umidade e compactação (10).

Junto à produção de CO_2 , há aumento de N_2 , N_2O , H_2 , CH_4 e H_2S dos processos anaeróbicos resultantes, sendo que este último é tóxico quando fica livre (1).

Tanto em microssítios, como a nível de rizosfera, essas reações induzem modificações importantes que limitam o desenvolvimento de outros microrganismos mais exigentes em condições aeróbicas. Este aspecto tem sido considerado de relevância para o caso de *Rhizobium* quando introduzido com leguminosas forrageiras perenes ou anuais para pastagens. Nestas condições, a bactéria precisa de aerobiose para sobreviver e persistir nas sucessivas estações de crescimento.

ALTERAÇÕES NA TEMPERATURA DO SOLO

Muitas das reações bioquímicas de responsabilidade microbiana são em parte, exotérmicas, produzindo calor que pode promover elevação da temperatura local. Esta modificação está em função direta da quantidade de substrato disponível para essas reações exotérmicas.

Essas reações normalmente não modificam sensivelmente a temperatura do solo, porém, em alguns habitats ou microssítios privilegiados, como são a rizosfera ou sítios de acúmulo de substratos metabolizáveis, o calor produzido pelas reações pode ter relevância na difusão dos gases, do vapor d'água e até beneficiando outros processos relacionados.

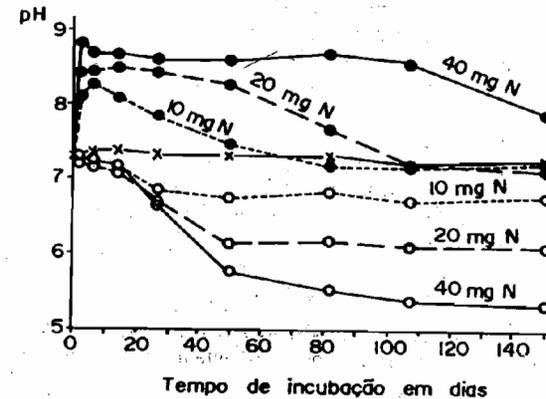


Figura 3. Aplicações de sulfato de amônio (O) e cianamida cálcica (●) induzem à acidificação e alcalinização do solo, respectivamente. Cada dose é expressa em mg de N por 100g de solo.

Na situação particular da compostagem, a elevação da temperatura ou termogênese microbiana é a expressão máxima das reações exotérmicas desenvolvidas por microrganismos predominantemente termófilos. As temperaturas atingidas superam os 50^o C, eliminando todo tipo de microrganismo mesófilico (5).

MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA DO SOLO

Devido ao tamanho semelhante dos microrganismos, principalmente das células bacterianas com as partículas de argila (mais ou menos 2 μ m), existe a possibilidade de existência de adesão ou ligação das partículas de argila às células microbianas. A natureza dessa adesão é principalmente química e mediada por substâncias cimentantes do tipo das gomas ou mucilagens (8). A figura 4 ilustra a distribuição dos microrganismos entre os microssítios e partículas do solo.

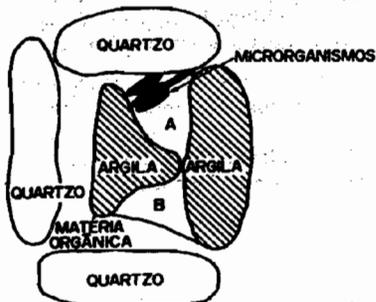


Figura 4. Modelo de agregado de solo com a presença de microrganismos (8).

A taxa de adesão dos microrganismos do solo às partículas minerais é, às vezes, considerável, podendo atingir até 90% da população. Isso dependerá da natureza do microrganismo sendo as bactérias gram-positivas mais facilmente adsorvidas, e da granulometria das argilas, onde a montmorilonita é mais eficiente que a caulinita. O diâmetro das partículas influi na adesão, de modo que, quanto menor o diâmetro, maior a adesão.

Os polissacarídeos produzidos por microrganismos também interagem com as partículas de argila, tendo influência na estabilização dos agregados dos solos.

Um solo com ótimo tamanho de agregados promove boas condições para o crescimento das plantas, particularmente para a penetração de raízes e a

emergência de caules jovens. Neste tipo de solo, os poros são adequadamente grandes para permitir rápida penetração de água de chuva, drenagem e retenção moderadas, apresentando, portanto boa umidade e boa aeração. Não há formação de crostas, são resistentes à erosão e são geralmente os mais recomendados para as práticas agrícolas.

A agregação depende não só da natureza e origem da substância cimentante, como também das condições do solo. Por exemplo, no hidromórfico permanente, há maior estabilidade e por mais tempo, porque a degradação microbiana da matéria orgânica é mais lenta. A calagem aumenta não só a estabilidade da estrutura pela maior floculação da argila, como também pelas condições favorecedoras ao desenvolvimento de uma microbiota agregante (9).

A vegetação exerce sobre a estrutura do solo um efeito direto e indireto, cuja importância está em função da sua perenidade e composição florística. O efeito mais marcante estaria numa pastagem permanente, onde a microbiota telúrica adquire características quase totalmente rizosféricas e as condições de agregação se tornam ideais. A rizosfera de gramíneas, principalmente, é mais rica em microrganismos capsulados sintetizadores de gomas. Seu crescimento radicular, aliás de tipo fibroso, favorece a redistribuição dos produtos formados no perfil do solo (6).

A figura 5 ilustra como todas essas variáveis podem interagir e atuar na formação dos agregados do solo.

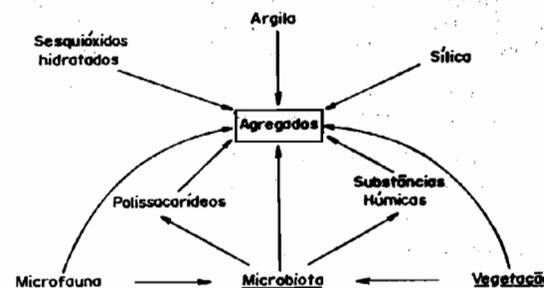


Figura 5. A gênese de agregados do solo e a interação dos agentes biológicos e não biológicos (5).

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology, 2.ed., New York, John Wiley & Sons, 1977. 467p.

2. ANDERSON, G. Assessing organic phosphorus. In: KWASANCH, F. SAMPLE, E. & KAMPRATH, E.J. eds. The Role of Phosphorus in agriculture, Am. Soc. Agron., 1980. p.411-431.
3. BAVER, L.D.; GARDNER, W.H & GARDNER, W.R. Soil physics, New York, John Wiley & Sons, 1972. 498p.
4. BUCKMAN, H.O. & BRADY, N.C. Natureza e propriedades dos solos. Rio de Janeiro, Livraria Freitas Bastos S.A., 1976. 594p.
5. DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. Écologie microbienne du sol, Paris, Masson et Cia., 1970. 766p.
6. ESTEY, R.H. Roots, rhizomes and rhizophaga. In: LOHN PERSSON ed., Soil organisms as components of ecosystems. 1976. 614p.
7. FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F. & YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Pl. Physiol., 28:21-24, 1977.
8. GREENWOOD, D.J. In: GRAY, T. & PARKINSON, D., eds. The Ecology of soil bacteria. Liverpool Univ. Press, 1968. p.138-157.
9. HEPPEL, C.M. Extracellular polysaccharides of soil bacteria. In: WALKER, N., ed. Soil Microbiology. A Critical review. London, Butterworth, 1976. 262:93-111.
10. MONIZ, A.C. Elementos de pedologia. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1975. 459p.
11. PARKER, C.A.; TRINICK, M.R. & CHATEL, D.L. Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. eds. A Treatise on dinitrogen fixation, New York, John Wiley & Sons, 1977. v.4. p.311-352.
12. PARKINSON, D. Soil microorganisms and plant root. In: BURGESS, A. & RAW, F. eds. Soil biology, London, Academic Press, 1967.
13. SINGLETON, P.W.; EL-SWAIFY, S.A. & BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *rhizobium* growth and survival. Appl. Env. Microbiol., Baltimore, 44:884-890, 1982.
14. SPRENT, J.I. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. III. Effects of osmotically applied stress. New Phytol., Oxford, 21:451-460, 1972.
15. SPRENT, J.I. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. New Phytol., Oxford, 21:603-611, 1972.
16. TABATABAI, M.A. Sulfur in agriculture. Madison, Wisconsin, Am. Soc. of Agronomy Inc., Crop Sci. Soc. of Am., Soil Sci. Soc. of Am. Publisher, 1986. 758p.
17. WALKER, N. Nitrification and nitrifying bacteria. In: WALKER, N. ed. Soil microbiology. A Critical review. London, Butterworths, 1975. 262p.
18. WATANABE, I. & CHOLITKUL, W. Nitrogen fixation in acid sulphate paddy soils. Tropical Agric. Res. Ser., Trinidad, 5:219-226, 1982.

O CICLO DO CARBONO NO SOLO

Carlos C. Cerri⁽¹⁾, Francis Andreux⁽²⁾ & Brigitte P. Eduardo⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

O carbono mineral na forma de gás carbônico é fixado através da fotossíntese pelas plantas verdes na forma de carboidratos, lignina, proteínas, lipídeos e outros compostos orgânicos. Com a senescência e morte dos órgãos vegetais aéreos, principalmente folhas e galhos, e a produção racinar, esse carbono orgânico é colocado em contato com o solo. Esses resíduos vegetais, assim como os de origem animal, não se acumulam indefinidamente no solo; com o tempo, todos se decompõem em gás carbônico e água. Se isto não ocorresse, uma fração resistente poderia agora estar cobrindo a superfície da Terra.

Os principais responsáveis por essa decomposição são os microorganismos do solo, cuja massa ou biomassa microbiana está permanentemente em renovação. Em áreas geologicamente estáveis, com superfícies cobertas por longo tempo com um mesmo tipo de vegetação, o solo apresenta uma condição de equilíbrio dinâmico onde as perdas anuais de matéria orgânica são balanceadas pelas entradas anuais. Esse processo é descrito como reciclagem ou "turnover", e para o carbono é definido como o fluxo através do conteúdo total de carbono de uma dada amostra de solo (9). O tempo de reciclagem é portanto a quantidade de carbono no solo ou parte dele, relativo a entrada anual deste elemento no sistema.

CONSTITUINTES ORGÂNICOS DO SOLO

Nos ecossistemas naturais, o carbono orgânico é incorporado ao solo por duas vias principais. A primeira é a via epígea e refere-se aos aportes

⁽¹⁾ CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

⁽²⁾ Convênio ORSTOM/CNPq - CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

originários dos restos vegetais e animais que se depositam na superfície do solo para formar serapilheiras ou folhedos, e ainda por compostos orgânicos liberados pelas folhas vivas e que são arrastados pela água da chuva, constituindo os pluviolixiviados. A outra via de entrada é endógena, onde os aportes são devidos à exsudação da raiz viva (rizodepósitos) ou aos produtos de decomposição quando a planta morre. Parte destas incorporações é utilizada para a manutenção e crescimento da biomassa microbiana (imobilização), parte se estabiliza na forma de substâncias humificadas (humificação) e parte é transformada em substâncias minerais solúveis ou gasosas, como o gás carbônico (mineralização). O esquema geral das transformações encontra-se na figura 1.



Figura 1. Representação esquemática da degradação de restos orgânicos.

Admite-se que os restos vegetais constituem a entrada primária de material orgânico para as populações faunísticas e microbianas do solo e que os corpos destas populações formam as entradas secundárias (21).

NATUREZA DOS RESÍDUOS VEGETAIS E ANIMAIS

Nesta seção poderá ser feita somente uma ampla generalização sobre os principais constituintes dos animais e plantas.

A composição química elementar (C, N, P, S e K) de algumas plantas, organismos e resíduos está apresentada no quadro 1. O carbono é o elemento predominante, com teores de até 60%, enquanto que o nitrogênio varia entre 0,13 e 15%. O fósforo, enxofre e potássio raras vezes ultrapassam 1%.

Quadro 1. Análise elementar expressa em matéria seca (adaptado de Jenkinson (8))

| Material orgânico | Carbono | Nitrogênio | Fósforo | Enxofre | Potássio |
|-------------------|---------|------------|---------|---------|----------|
| | % | | | | |
| Bactéria | 50 | 15 | 3,2 | 1,1 | ... |
| Actinomiceto | 50 | 11 | 1,5 | 0,4 | 1,8 |
| Fungo | 44 | 3,4 | 0,6 | 0,4 | 0,6 |
| Minhoca | 46 | 10 | 0,9 | 0,8 | 1,1 |
| Milho | 44 | 1,4 | 0,2 | 0,17 | 0,9 |
| Alfafa | 45 | 3,3 | 0,28 | 0,44 | 0,9 |
| Madeira | ... | 0,13 | 0,006 | 0,005 | 0,03 |
| Esterco | 37 | 2,8 | 0,54 | 0,7 | 5,1 |

A fonte de energia disponível nos resíduos vegetais e animais, usada pelos organismos do solo (decompositores), está contida numa ampla variedade de compostos orgânicos tais como carboidratos (polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos), lignina, proteínas, lipídeos e pigmentos, entre outros compostos orgânicos.

O substrato orgânico mais abundante incorporado ao solo é um polissacarídeo denominado celulose, o qual constitui 30 a 60% dos resíduos vegetais. A celulose é um polímero não ramificado (β 1,4) de glicose (Figura 2) presente nas paredes das células das plantas superiores, algas e em alguns fungos. Poucas bactérias sintetizam celulose como um polissacarídeo exocelular.

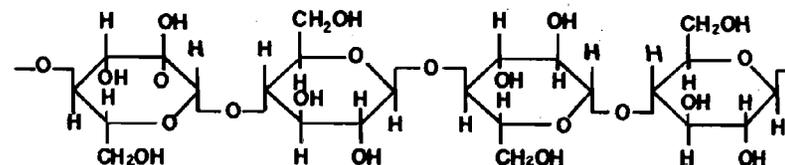


Figura 2. Estrutura da celulose.

As hemiceluloses (Figura 3) e componentes pécicos são polissacarídeos formados por heteropolímeros altamente ramificados. Alguns desses polissacarídeos servem como reserva de energia e outros como o xiloglican, arabinogalactan e rhamnogalacturonan formam a estrutura da parede celular dos vegetais.

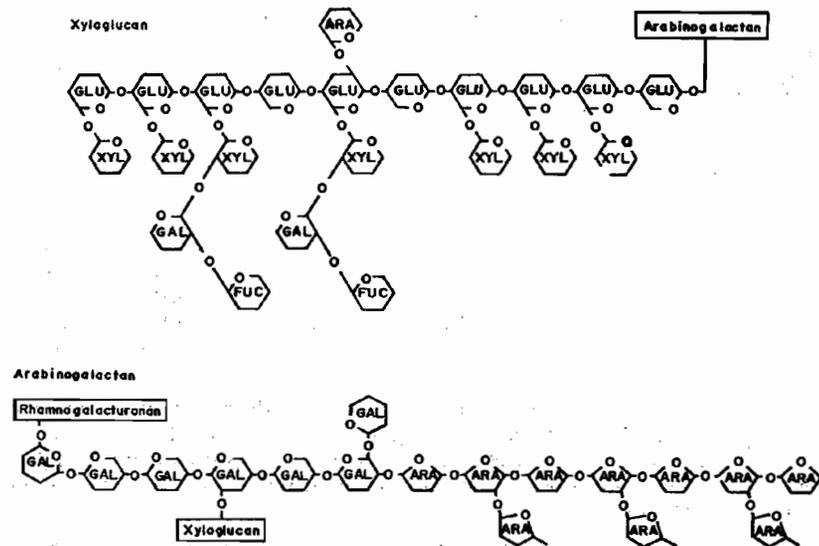


Figura 3. Hemicelulose - Xiloglucan, Heteropolímero da Xilose (XYL) Glicose (GLU) e Galactose (GAL); Arabinogalactan.

A figura 4, elaborada por Albersheim (1), representa a possível arquitetura da parede celular das plantas e mostra a relação das fibras de celulose entre si e suas ligações com vários glicans na matriz de hemicelulose.

A lignina é um polímero muito complexo formado por uma combinação de unidades fenilpropano (álcoois betaconiferílico, cumárico e sinápico), arranjados em três dimensões (Figura 5).

Os três constituintes vitais das substâncias celulares, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, estão presentes em todos os resíduos vegetais e animais que entram no solo. A quantidade de proteína varia desde menos de 1% na madeira, até mais de 50% nas bactérias (8). A maior parte do nitrogênio orgânico entra no solo através dos restos vegetais e animais. Fazem parte ainda da composição dos seres vivos quantidades significativas de monossacarídeos, aminoácidos livres e peptídeos, além de quantidades reduzidas de clorofila, pigmentos, resinas, terpenos, alcalóides e taninos que são também incorporados naturalmente ao solo.

PRINCIPAIS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas específicas. Elas se ligam à molécula do substrato para formar um complexo enzima-substrato transitório, o qual se degrada e origina a enzima livre e os produtos de degradação (13).

Os processos de humificação e mineralização ocorrem sob ação de enzimas específicas. Os grupos mais importantes encontrados no solo estão no quadro 2.

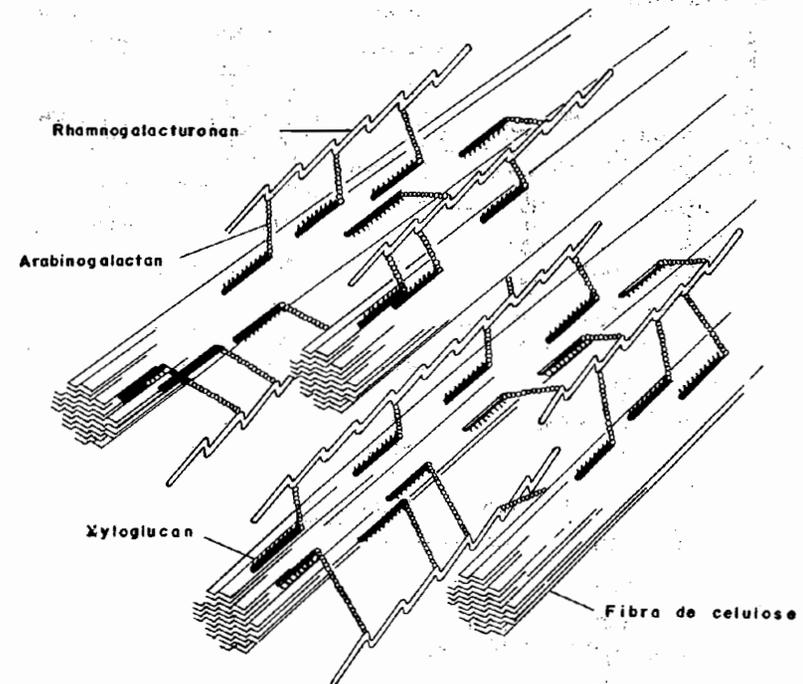


Figura 4. Modelo tridimensional de uma parede celular vegetal. Esquema inicial elaborado por Keegstra modificado por Albersheim (1).

De acordo com Ladd (12) as enzimas podem ser classificadas através de sua origem ou seu modo de ação. As exoenzimas ("abiotic enzymes") ou "enzimas cumuladas" são definidas como aquelas que agem extracelularmente, quer na solução do solo, ou então acopladas a componentes inorgânicos ou orgânicos do solo. Elas são liberadas por animais, plantas (sobretudo pela raiz) e microrganismos ou, ainda, estão presentes nas células mortas de restos orgânicos. As endoenzimas agem nas células microbianas em proliferação. Admite-se que espécies diferentes têm complexos enzimáticos diferentes e é devido a isso que se explica a diversidade de nichos ecológicos.

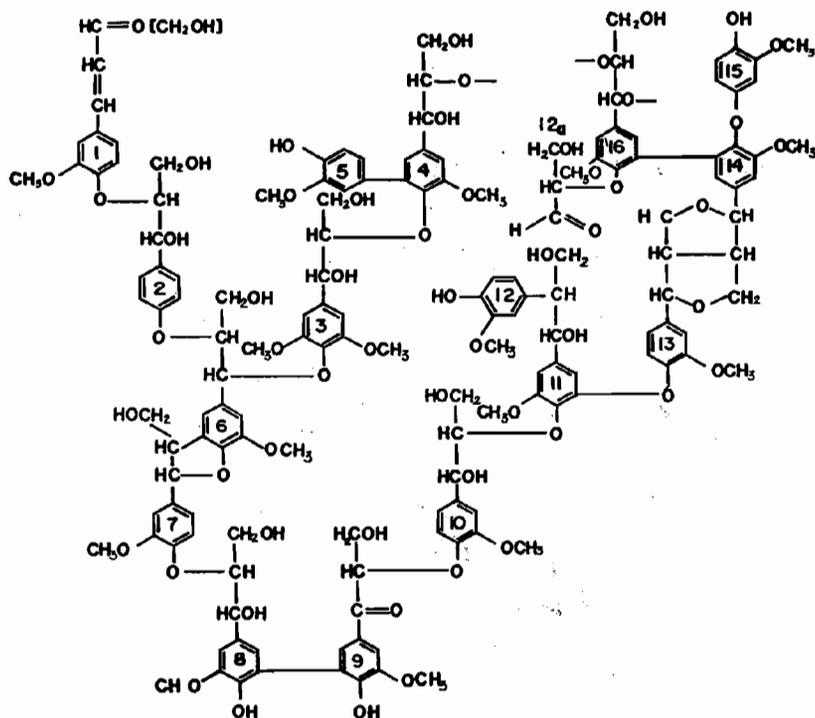


Figura 5. Estrutura da lignina.

Quadro 2. Principais enzimas do solo

| Enzima ou sistema enzimático | Reação catalisada |
|------------------------------|---|
| Asparaginase | Asparagina + H ₂ O → Aspartato + NH ₃ |
| Celulase | Hidrólise de ligações -1,4 glucan |
| Deamidase | Ácido carboxílico amido + H ₂ O → Ácido carboxílico + NH ₃ |
| Desidrogenase e Glicosidase | XH ₂ + aceptor → X + aceptor.H ₂ Glicosídeo + H ₂ O → ROH + glucose |
| Lipase | Triglicéride + 3H ₂ O → glicerol + 3 Ácidos graxos |
| Nucleotidase | Desfosforilação de nucleotídeos |
| Fenoxidase | Difenol + 1/2 O ₂ → Quinona + H ₂ O |
| Fosfatase | Éster fosfatado + H ₂ O → ROH + PO ₄ ⁻⁻⁻ |
| Fitase | Inositol hexafosfato + 6H ₂ O → Inositol + 6PO ₄ ⁻⁻⁻ |
| Protease | Proteínas → Peptídeos e aminoácidos |
| Pirofosfatase | Pirofosfato + H ₂ O → 2PO ₄ ⁻⁻⁻ |
| Urease | Uréia → 2NH ₃ + CO ₂ |

Como os polissacarídeos são os compostos orgânicos mais abundantes, a decomposição e mineralização de seus produtos tem um significado especial no ciclo do carbono no solo. Essa decomposição é catalisada pelas polisacaridases (4,11).

Outra enzima de extrema importância é a urease, a qual degrada uréia e tem como produtos finais o ácido carbônico e a amônia.

As enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação de aminoácidos; as exopeptidases separam os grupos livres (-COOH, -NH₂) do final das cadeias.

Conforme foi mostrado na figura 5, devido à sua complexidade, a lignina é um dos compostos mais difíceis de se decompor. Para tanto, é necessário um sistema de enzimas específicas, que só se encontra em poucas espécies de microrganismos, como os fungos basidiomicetos e bactérias lignolíticas. Após a primeira fase de degradação, os compostos aromáticos liberados podem ser metabolizados por uma população bastante diversificada de microrganismos (21).

Certas enzimas são ubíquas, ou seja, são encontradas em quase todos os solos. Exemplos típicos são a urease, catalase, e fosfatase. Outras enzimas são produzidas no solo somente sob circunstâncias especiais, como por exemplo a desidrogenase que parece estar condicionada à quantidade de matéria orgânica decomponível e intimamente relacionada à biomassa do solo (20).

Os primeiros produtos da degradação microbiana são passíveis de serem utilizados como fonte de energia para os grandes ciclos metabólicos, ou então, reciclados pelas sínteses microbianas. Podem ainda evoluir mais ou menos rapidamente por oxidação para policondensados pré-húmicos.

BIOMASSA MICROBIANA

Por definição (9), a biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo, excluídas as raízes e animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}$. Com poucas exceções, ela representa 2 a 3% do carbono orgânico do solo, sendo que sua presença está relacionada diretamente com o teor de matéria orgânica.

Os microbiologistas fixaram o conceito da relação direta entre nível de atividade da biomassa microbiana com a fertilidade do solo, tanto em ambientes naturais, como manipulados pelo homem, tornando evidente a necessidade de desenvolvimento de métodos simples e confiáveis para a determinação da grandeza da população. Para qualquer domínio da Ciência do Solo, é interessante determinar as quantidades de C, N ou P que entram na composição do seu compartimento vivo, ou seja, a biomassa microbiana.

Diversos trabalhos de revisão sobre os métodos de quantificação da biomassa microbiana do solo já foram publicados (6;9;16).

DECOMPOSIÇÃO DE RESTOS VEGETAIS E ANIMAIS

Os processos de degradação enzimática microbiana das paredes celulares dos vegetais são conhecidos por celulólise e ligninólise.

Na celulólise, que é um processo rápido, a celulose é hidrolisada sob ação do complexo enzimático microbiano, em oligossacarídeos e glicose. As hemiceluloses são degradadas inicialmente para oligossacarídeos energéticos e posteriormente à xilose. As pectinas são transformadas em ácidos urônicos, após uma passagem por oligossacarídeos energéticos.

A lignina é considerada a principal fonte da matéria húmica do solo. Devido a sua estrutura polifenólica muito estável (Figura 5), sua degradação (ligninólise) é um processo relativamente lento. Suas etapas de transformação serão descritas posteriormente, no item **Gênese das substâncias húmicas** desse capítulo.

Outros polifenóis presentes nos vacúolos dos vegetais, sob a forma de heterosídeos, como os taninos, são também liberados por hidrólise enzimática. Como eles são muito reativos ao ar, se oxidam espontaneamente em pigmentos

marrons do tipo húmico. Entre os taninos, os chamados condensados podem constituir precursores dessas substâncias húmicas.

Os exsudatos, produzidos pela atividade das raízes das plantas vivas, são compostos hidrofílicos solúveis ou coloidais, formados por proporções de proteínas e polissacarídeos variáveis segundo a planta, seu desenvolvimento vegetativo e as características físicas e químicas do solo (ver capítulo 4). Em geral a fração de polissacarídeos predomina e contém uma alta proporção de ácidos poliurônicos (Figura 6), cujos grupos carboxílicos são responsáveis pela propriedade da troca catiônica desses compostos.

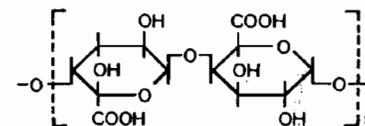


Figura 6. Exemplo de substância liberada pelas raízes (ácido poligalacturônico).

Com a morte das células, os constituintes nitrogenados são transformados por autólise; os aminoácúcares evoluem para aminas e as proteínas para aminoácidos e polipeptídeos hidrossolúveis. A degradação dos ácidos nucleicos libera as bases púricas e pirimídicas que se associam às substâncias húmicas ou então são adsorvidas às superfícies dos argilominerais.

Os constituintes hidrogenados das paredes manifestam maior remanescência nos solos, devido à sua menor velocidade de decomposição. É particularmente o caso da quitina, que constitui uma das principais moléculas estruturais dos artrópodos e dos fungos, e do ácido murâmico, seu homólogo das paredes bacterianas (Figura 7).

As clorofilas são rapidamente degradadas, mas os produtos finais, os feoforbídeos, podem permanecer no meio em quantidades muito pequenas por longo tempo, podendo ser usados como traçadores geoquímicos. Os pigmentos carotenóides, as graxas e ceras são também lentamente oxidadas.

Uma representação gráfica elaborada por Minderman (15) sobre a velocidade de decomposição dos principais constituintes vegetais em condições temperadas está representada na figura 8.

Esta figura confirma a elevada estabilidade relativa dos fenóis e das graxas, comparada com aquela dos carboidratos.

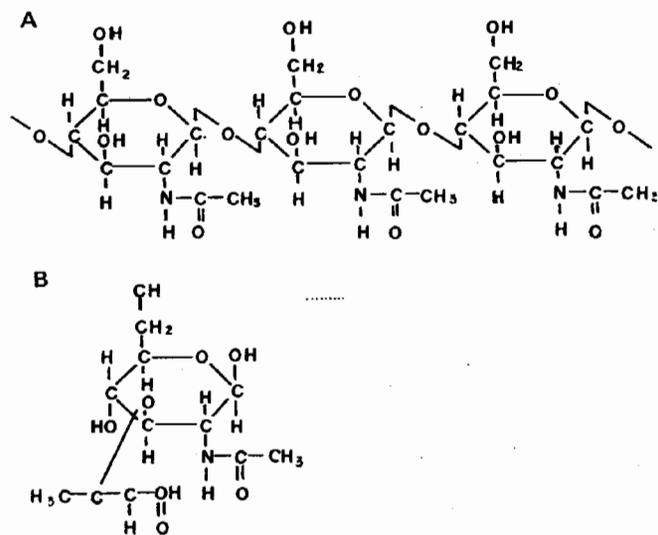


Figura 7. Constituintes das paredes celulares de microrganismos. A: Quitina: parede celular dos fungos. B: Ácido murâmico: parede celular das bactérias.

HÚMUS

GÊNESE DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A gênese das substâncias húmicas ou humificação é a parte do ciclo do carbono na qual as formas orgânicas do carbono se acumulam e se estabilizam no solo como indicado na figura 9.

Apesar dos inúmeros estudos, a determinação da estrutura das substâncias húmicas, bem como a bioquímica de sua formação constituem ainda hoje um dos aspectos pouco compreendidos da química do húmus. Várias obras de síntese já foram escritas sobre o assunto, das quais destacamos: Kononova (10), Schnitzer e Khan (18), Giesecking (5) e Stevenson (19).

Existem pelo menos quatro vias principais, esquematizadas na figura 10, de formação das substâncias húmicas durante a decomposição de resíduos no solo (19). O principal processo é a oxidação de substratos hidrolisados monoméricos, para conduzir a polímeros macromoleculares de cor mais ou menos escura e de peso molecular geralmente elevado.

Os primeiros estudos consideravam que o húmus era formado diretamente de produtos de degradação microbiana incompleta da lignina. A teoria representada pela via 4 foi proposta por Waksman (24) e resulta das principais modificações da lignina, que perde os grupos metoxil (CH_3O) com geração de hidroxifenóis e a oxidação de cadeias alifáticas para formar os grupos COOH . Transformações posteriores mal conhecidas levam até a produção de ácidos húmicos e depois os fúlvicos que, juntamente com a humina, formam o húmus do solo.

Na via 3, os aldeídos e ácidos fenólicos, liberados pela lignina durante o ataque microbiano, convergem enzimaticamente para quinonas, as quais se polimerizam na presença de compostos nitrogenados para formar macromoléculas parecidas com o húmus.

A via 2 é similar à via 3 exceto que os polifenóis são sintetizados por microrganismos a partir de fontes de carbono não lignínicas, como por exemplo, a celulose. Os polifenóis são então enzimaticamente oxidados a quinonas e convertidos para substâncias húmicas.

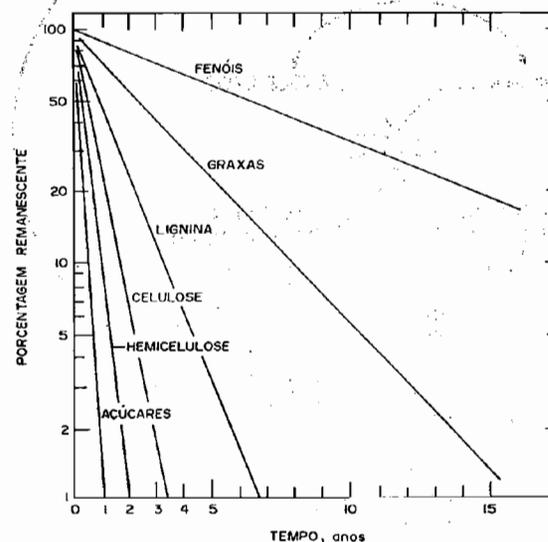


Figura 8. Curvas de decomposição de constituintes orgânicos dos vegetais (adaptado de Minderman, (15)).

A teoria da formação do húmus a partir de açúcares (via 1) é talvez a mais antiga. Segundo Maillard (14), os açúcares redutores e aminoácidos, formados como produtos intermediários do metabolismo microbiano, continuam o processo de polimerização não enzimática para formar polímeros nitrogenados pardos semelhantes ao húmus.

As vias 2 e 3, de acordo com Stevenson (19), formam as bases da popular teoria dos polifenóis.

As quatro vias podem operar simultaneamente no solo, porém, não com a mesma extensão ou na mesma ordem de importância. A via da lignina pode operar predominantemente em solos mal drenados e em áreas hidromórficas,

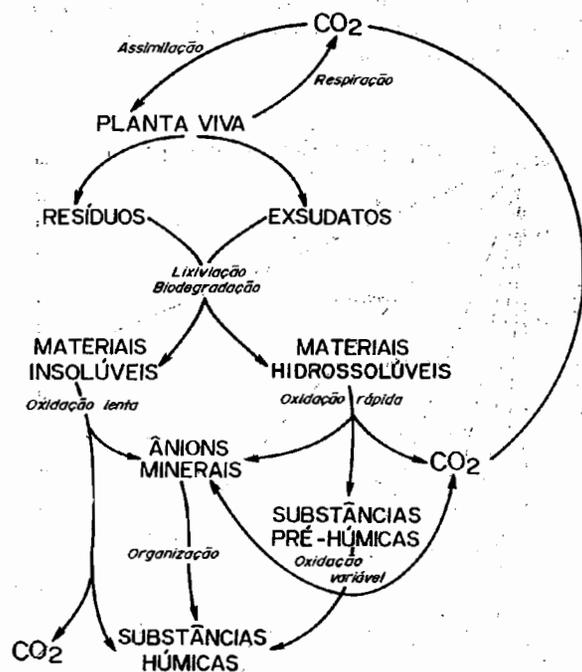


Figura 9. Ciclo do carbono no solo.

enquanto que a síntese a partir de polifenóis, nos lixiviados da serapilheira, podem ser de considerável importância para certos solos sob floresta. Devido à rápida assimilação biológica dos açúcares, a teoria da condensação de aminoaçúcares é válida principalmente para meios de baixa atividade biológica.

A estrutura hipotética dos ácidos húmicos e fúlvicos pode ser vista na figura 11.

As substâncias húmicas consistem de uma mistura heterogênea de compostos, muitos deles ligados entre si ao acaso, tornando-se praticamente impossível representar a estrutura exata de seus encadeamentos moleculares.

Pode-se observar no esquema da figura 11 que os ácidos húmicos apresentam grupos fenólicos OH livres e ligados, estruturas de quinonas, unidades de oxigênio como ponte e grupos COOH variadamente dispostos no anel aromático. Mostra também o nitrogênio como um componente estrutural, e ainda a ocorrência de carboidratos e proteínas. Os ácidos fúlvicos são constituídos basicamente por ácidos fenólicos e benzocarboxílicos, ligados entre si por pontes de hidrogênio com abundância de grupos COOH formando uma estrutura polimérica de estabilidade considerável.

Os principais componentes do húmus constam do quadro 3. Não há grandes diferenças na composição do húmus de regiões climáticas distintas do globo terrestre.

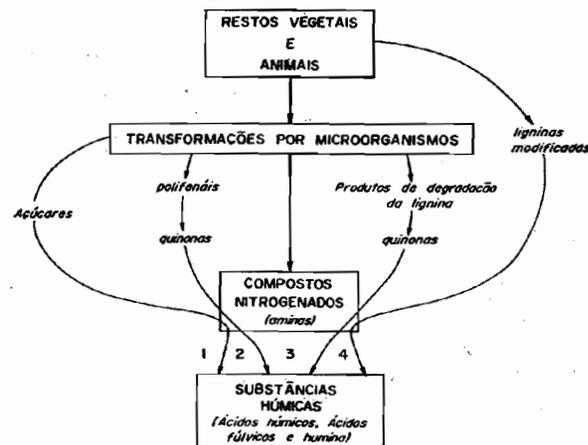


Figura 10. Mecanismos de formação das substâncias húmicas (Stevenson, 19).

FUNÇÕES DO HÚMUS NO SOLO

A matéria orgânica em geral favorece o processo de agregação das partículas do solo. O papel dos polissacarídeos nesse processo é de extrema importância (7,22).

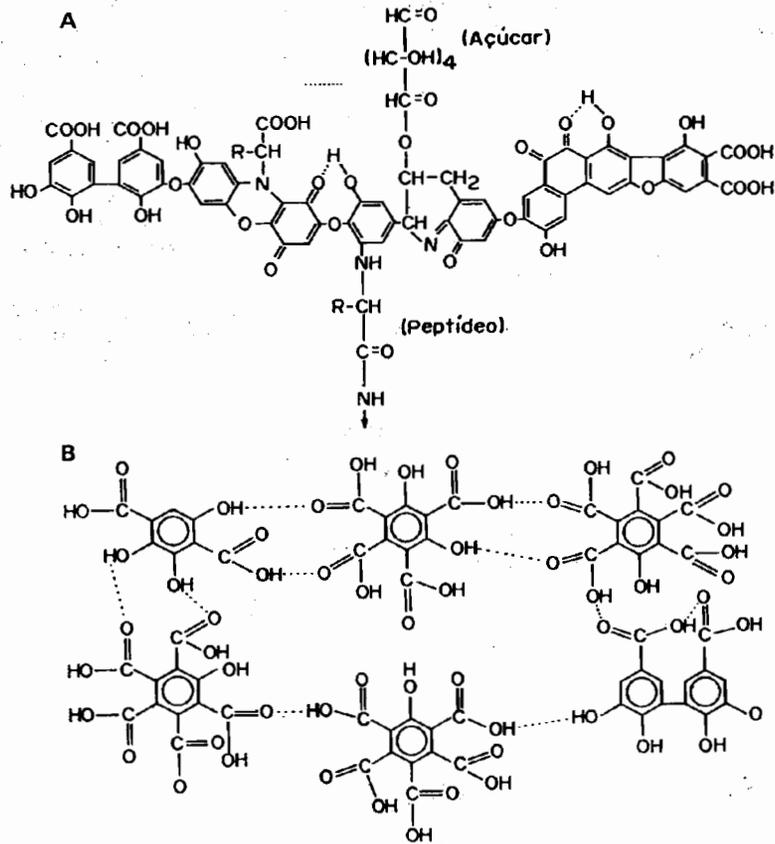


Figura 11. A: Estrutura hipotética dos ácidos húmicos (Stevenson, 20). B: Estrutura hipotética dos ácidos fúlvicos (Schnitzer & Khan, 18).

Quadro 3. Principais compostos orgânicos presentes nos solos

| Compostos de enxofre | Compostos do fósforo | Compostos fenólicos | Compostos nitrogenados | Glucídios | Lipídios | Moléculas orgânicas simples |
|---|----------------------|--|--|-------------------------|--|-------------------------------------|
| Aminoácidos (cisteína, metionina) | Inositolfosfatos | Ácidos e aldeídos fenólicos | Aminoácidos Bases nucleicas | Oses Ácidos urônicos | Hidrocarbonetos leves Ácidos graxos | Moléculas orgânicas simples |
| Ester sulfatos | Fosfolipídeos | Ácidos fenólicos | Osaminas | Ácidos silíficos | Glicérides Clorofilas Esteróis Terpenos | |
| Vitaminas Tiamina, biotina Coenzima A | Ácidos nucleicos | Flavonóides Pigmentos vegetais e animais diversos | Peptídeos | Polissacarídeos | Ceras, resinas | Moléculas orgânicas Policondensadas |
| Fósforo e enxofre orgânicos não identificados | | Ligninas | Homoproteínas Heteroproteínas | | Hidrocarbonetos Polinudeares | |
| | | | Melaninas animais vegetais fúngicas | | | Sistema Organo-Mineral |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Complexidade crescente

Entre as propriedades químicas do solo que envolvem a matéria orgânica, estão aquelas relacionadas com a fixação, o armazenamento e a liberação de nutrientes. A capacidade de troca catiônica está ligada às cargas negativas de superfície distribuídas entre os argilominerais e a matéria orgânica (19). Neste último caso, os grupos ionizáveis, principalmente os carboxílicos e fenólicos, são aqueles que dão origem a cargas essencialmente dependentes do pH, ou seja, quanto menor o pH do solo, menor a dissociação e a troca de cátions. Nos solos, existe uma proporção variável de matéria orgânica persistente na forma hidrolisável, que tem como propriedade abaixar o grau de oxidação dos cátions metálicos, e portanto favorecer a sua solubilização e a migração na forma de complexos. Este fenômeno conhecido como queluviação aumenta com a acidez do solo e predomina nos podzóis (23). O húmus tem uma função nutricional, na medida em que serve como um reservatório de lenta liberação de nitrogênio, fósforo e enxofre para o crescimento das plantas.

Quando o equilíbrio de um ecossistema natural é rompido e o solo utilizado para fins agrícolas, nota-se que, apesar da incorporação dos restos da cultura, o solo se torna cada vez mais pobre em carbono (2,3,10,17).

Utilizando a técnica isotópica do ^{13}C , foi possível acompanhar os ganhos e perdas de matéria orgânica e estabelecer a sua origem, em solo desmatado cultivado com cana-de-açúcar (Figura 12).

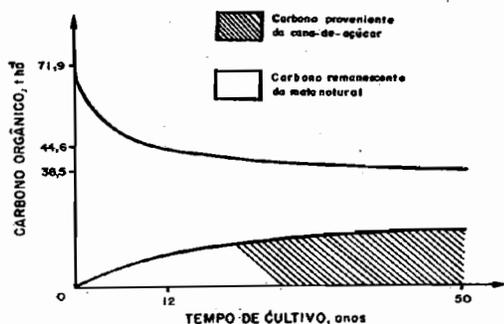


Figura 12. Curva de variação do estoque de carbono orgânico do solo total proveniente da cana-de-açúcar e remanescente da mata natural, em função do tempo de cultivo.

CONCLUSÕES

Para uma boa compreensão dos processos integrantes do ciclo do carbono, pode-se dividi-lo em três fases principais:

1. Uma fase anabólica ou de organização do dióxido de carbono atmosférico, principalmente pelos organismos fotossintetizadores;

2. Uma fase de liberação dos produtos fotossintetizados e de sua estabilização no solo.

3. Uma fase catabólica ou de mineralização de substratos orgânicos e de transferência do carbono mineral à atmosfera.

Dentre estas três fases, a segunda e a maior parte da terceira ocorrem no solo, constituindo o *CICLO INTERNO DO CARBONO*. Na maioria das reações bioquímicas envolvidas nesse ciclo, participam compostos de nitrogênio, fósforo, enxofre e outros nutrientes, através da atividade dos microrganismos do solo. A biomassa microbiana representa uma fração quase desprezível do carbono do solo, embora se possa considerar que ela controla a maior parte das reações que integram o ciclo interno do carbono, conseguindo balancear globalmente a fotossíntese através dos processos de respiração edáfica.

LITERATURA CITADA

- ALBERSHEIM, P. The wall of growing plant cells. *Sci. Amer.*, New York, 232(4):80-9b, 1975.
- ALLISON, F.E. Soil organic matter and its role in crop production. Amsterdam, Elsevier, 1973. 637p.
- CERRI, C.C. Dinâmica da matéria orgânica no agrossistema cana-de-açúcar. 1986. 197p. (Tese de livre docência)
- FINCH, P.; HAYES, M.H.B. & STACEY, M. The biochemistry of soil polysaccharides. In: McLAREN & SKUJINS, eds., *Soil biochemistry*. New York, Marcel Decker, 1971. p.257-319, v.2.
- GIESEKING, J.E. Soil components. Organic components. Berlin, Lange Springer, 1975. 534p.
- GRISI, B.M. Metodologia da determinação de biomassa microbiana de solo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 8:167-172, 1984.
- GUCKERT, A. Rôle des polysaccharides dans les processus d'agregation du sol. Paris, Institut National Agronomique, 1985. p.115-138.
- JENKINSON, D.S. The chemistry of soil process. New York, John Wiley & Sons, 1981. p.505-555.
- JENKINSON, D.S. & LADD, J.N. Soil biochemistry. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds. New York, Marcel Dekker, 1981. p.415-471. v.5.

10. KONONOVA, M.M. Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility. Oxford. Pergamon Press, 1966. 450p.
11. KISS, S.; DRAGAN-BULARDA, M. & RADULESCU, D. Soil enzymes. In: BURNS, R.G., ed. London, Academic Press, 1978. p.117-147.
12. LADD, J.N. Origin and range of enzymes in soil. In: BURNS, R.G. ed., Soil enzymes. London, Academic Press, 1978. 380p.
13. LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Sarvier, 1986. 725p.
14. MAILLARD, L.C. Identité des matières humiques de synthèse avec matières humiques naturelles. Ann. Chimie, Paris, 1917. p.113-152.
15. MINDERMAN, G. Addition, decomposition and accumulation of organic matter in forests. J. Ecol., London, 56:360, 1960.
16. NICOLARDOT, B.; CHAUSSOD, R. & CATROUX, G. Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. "Science du Sol - Bulletin de l'A.F.E.S.", Versailles, 1982. p. 253-261.
17. NYE, P.H. & GREENLAND, D.J. Changes in the soil after clearing tropical forest. Pl. Soil, Hague, 21(1):101-102, 1964.
18. SCHNITZER, M. & KHAN, S.U. Soil organic matter. Amsterdam, Elsevier, 1978. 319p.
19. STEVENSON, F. J. Humus chemistry. New York, John Wiley & Sons, 1982. 443p.
20. STEVENSON, F. J. Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients. New York, John Wiley & Sons, 1985. 380p.
21. SWIFT, M. J.; HEAL, O.W. & ANDERSON, J.M. Decomposition in terrestrial ecosystems. Studies in ecology, Essex, Blackwell Scientific Publications, 1979. 372p.
22. TISDALL, J.M. & OADES, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. J. Soil Sci., London, 33:141-143, 1982.
23. TURENNE, J.F. Modes d'humification et différenciation podzolique. França, ORSTOM, 1977. 173p. (Tese)
24. WAKSMAN, S.A. Humus, origin, chemical composition and importance in nature. London, Ballieré. Tindall and Cox. 1936. 76p.

POLUIÇÃO ORGÂNICA E SEU CONTROLE

Márcio R. Lambais⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma grande convergência de interesses nas questões ambientais, e muito se tem debatido sobre elas. A poluição ambiente está estritamente relacionada com a atividade humana. Bockris (4) diz que o homem é o poluente básico e original, pois durante o longo período de existência do planeta e dos animais, sempre houve um desenvolvimento ecológico harmonioso, perturbado no curto período de existência do homem. Esse distúrbio era inevitável, pois de difícil controle a produção e o acúmulo de resíduos resultantes do desenvolvimento da atividade humana, visando a adequação do meio ambiente às suas necessidades de maior conforto e à produção de alimentos para uma população com taxa de crescimento muito elevada. Os complexos sistemas microbiológicos que reciclam esses resíduos desenvolveram-se ao longo de milhões de anos, principalmente no solo. No entanto, a taxa de degradação dos resíduos é extremamente inferior à sua taxa de geração, e, além disso, muitos dos resíduos não são compostos naturais, e sim sintetizados pelo homem.

POLUENTES ORGÂNICOS POLUENTES ORGÂNICOS NATURAIS

Os resíduos orgânicos têm sido utilizados há séculos para melhorar a produção agrícola, através de sua incorporação direta ao solo. No entanto, a

⁽¹⁾ Departamento de Ciência do Solo. ESALQ/USP. Caixa Postal 9, CEP 13400 Piracicaba, SP.

microbiota do solo possui uma capacidade limitada para mineralizar esses resíduos, de forma que sua aplicação excessiva é capaz de poluir o solo.

A biodegradação de um resíduo orgânico pode ser feita pelos mais variados caminhos metabólicos, dependendo de sua composição, mas tem por objetivo principal a obtenção de energia e precursores metabólicos para a síntese celular (Figura 1). Os grandes polímeros orgânicos são degradados enzimaticamente a moléculas menores e solúveis, que são assimiladas e metabolizadas no interior das células microbianas.

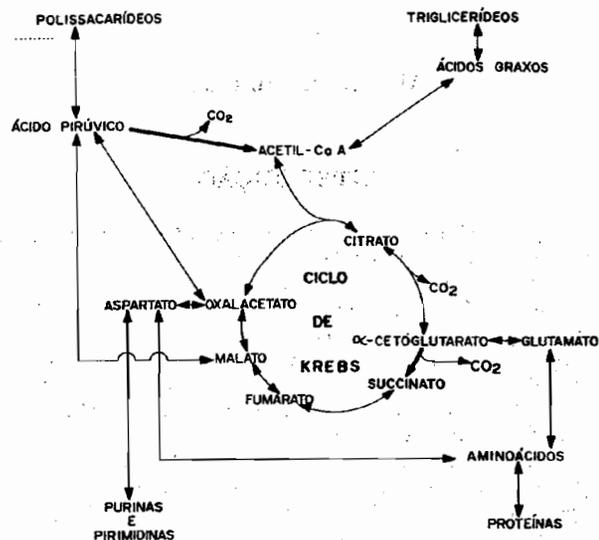


Figura 1. Interconversões no metabolismo microbiano.

Os processos de degradação de compostos orgânicos naturais, como celulose, hemicelulose, lignina e amido podem ser vistos com maiores detalhes no capítulo 6.

A taxa de degradação das moléculas orgânicas depende basicamente de sua estrutura química. A biodegradabilidade diminui com a redução do tamanho da cadeia; e as formas insaturadas são menos biodegradáveis do que as saturadas, da mesma forma que as cadeias ramificadas em relação às lineares e

as cíclicas, em relação às abertas (15), conforme o esquema apresentado na figura 2. Os alcanos mais comuns na natureza são C₇-C₃₆ e o metano (CH₄), podendo ocorrer algumas formas metiladas em ceras de folhas de fumo, algodão e cana-de-açúcar. A especificidade de degradação aumenta, à medida que aumenta a biorresistência da molécula, isto é, microrganismos capazes de degradar núcleos aromáticos normalmente degradam alcanos ramificados, mas não cicloalcanos (Figura 2).

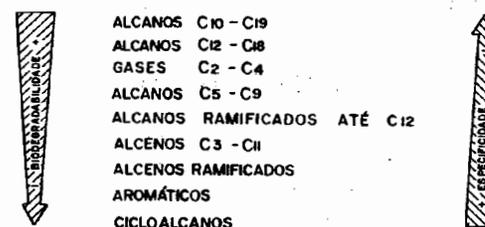


Figura 2. Biodegradabilidade e especificidade de degradação de vários hidrocarbonetos (segundo Perry & Cerniglia, 1973, citados por Overcash & Pat (15)).

POLUENTES ORGÂNICOS SINTÉTICOS (XENOBIÓTICOS)

Dentre os poluentes orgânicos sintéticos, os pesticidas são os de maior interesse agrônomo, devido às quantidades extremamente elevadas em que eles são utilizados e porque, via de regra, seu destino final é o solo.

Vários aspectos do comportamento dos pesticidas no solo podem ser vistos com maiores detalhes no capítulo 24.

Muitos microrganismos do solo são capazes de degradar vários pesticidas, com maior ou menor rapidez, dependendo principalmente da composição química dos mesmos (Quadro 1) (6).

PROCESSOS DE TRATAMENTO MICROBIOLÓGICO

Os resíduos orgânicos devem passar por um sistema de tratamento para redução de sua carga poluente, medida normalmente como DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) ou DQO (Demanda Química de Oxigênio). A DBO é

definida como a quantidade de O_2 ($mg.l^{-1}$) consumida por microrganismos na degradação da matéria orgânica, a $20^\circ C$, num período de 5 dias. A DQO é a quantidade de O_2 necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica, através do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido a $160^\circ C$.

Quando a matéria orgânica é facilmente biodegradável, a relação DQO/DBO tende a 1. Essa relação pode ser usada para estimar a biodegradabilidade relativa de um resíduo orgânico. Uma baixa relação DQO/DBO pode indicar uma alta biodegradabilidade, enquanto que uma alta relação pode indicar que o resíduo possui apenas uma pequena parte que é prontamente biodegradável (Quadro 2).

COMPOSTAGEM

O processo de compostagem pode ser definido como uma decomposição aeróbica e termofílica de resíduos orgânicos por populações microbianas quimiorranotróficas existentes nos próprios resíduos, sob condições controladas, que produz um material parcialmente estabilizado de lenta decomposição, quando em condições favoráveis (16).

Quadro 1. Bactérias do solo que degradam pesticidas (Alexander (1), Chakrabarty (6))

| Bactérias | Compostos |
|--|--|
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> <i>Arthrobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Moraxella</i> | Monofluor e monocloroacetato, monocloro e monobromopropinato, monoclorobutanoato, dicloropropinato, cloroetano, clorometano, cloroetanol |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> | Cloropirrina, 2,3-dicloroalilmercaptana |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Bacillus</i> | 3 ou 4-Clorobenzoato, 3,5 ou 2,6-diclorobenzoato, mono, di, tri ou pentaclorofenol, clorosalicilato, clorotolueno |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> | Mono ou diclorobifenil |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> | Clorofenoxiacetatos |
| <i>Pseudomonas</i> | Clorofenil-dimetiluréia |
| <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> | Ác. mono-diclorofenoxiacético |
| <i>Achromobacter</i> , <i>Mycoplana</i> | Ác. metil-clorofenoxiacético |
| <i>Agrobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> | Ác. dicloropropiônico |
| <i>Corynebacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> | Dinitrobutilfenol |
| <i>Pseudomonas</i> | Ác. Tricloroacético |

Quadro 2. Relação DQO/DBO de alguns tipos de resíduo (Verstraete & Vaerenbergh (19))

| Resíduo | DQO | DBO ₅ ⁽¹⁾ | DQO/DBO ₅ |
|--|--------|---------------------------------|----------------------|
| | | mg.l ⁻¹ | |
| Esgoto doméstico bruto | 500 | 300 | 1,67 |
| Esgoto doméstico tratado | 50 | 10 | 5,00 |
| Vinhaça | 60.000 | 30.000 | 2,00 |
| Resíduo de curtume | 13.000 | 1.270 | 10,24 |
| Resíduo bruto de indústria de celulose e papel | 620 | 226 | 2,74 |
| Resíduo tratado de indústria de celulose e papel | 250 | 30 | 8,33 |

(1) DBO₅ determinada após 5 dias de incubação.

Populações de bactérias, fungos e actinomicetos utilizam a matéria orgânica como fonte de C e energia, além de N, P e outros nutrientes necessários ao crescimento e síntese de proteínas.

As vantagens da utilização do processo de compostagem são:

- não formação de gases mal cheirosos;
- diminuição do volume, peso e teor de umidade, em relação ao material não compostado, facilitando o armazenamento, transporte e disposição do resíduo;
- inativação de patógenos (19); e
- a possibilidade de utilização do produto final (composto) na agricultura, contribuindo para a reciclagem dos nutrientes contidos no resíduo.

A compostagem pode ser feita em pilhas, com ou sem aeração forçada, ou em reatores fechados com controle de aeração, umidade, temperatura e tempo de retenção. Nestes últimos, o processo pode se completar entre 5 e 7 dias, enquanto que, em pilhas, pode levar de 3 a 8 semanas, ou até mais, para se produzir um composto satisfatório.

O processo pode ser separado em duas fases: estabilização e maturação. Durante a fase de estabilização, a temperatura atinge aproximadamente $70-75^\circ C$, devido à atividade microbiana, caindo posteriormente. No início do processo de compostagem, os microrganismos quimiorranotróficos (mesofílicos) oxidam a matéria orgânica facilmente decomponível, gerando calor, o que favorece o desenvolvimento dos microrganismos termofílicos, e a inativação de microrganismos patogênicos, como coliformes, *Salmonella*, *Streptococcus* e *Aspergillus fumigatus* (3). Com a diminuição da fonte de energia, a temperatura declina rapidamente, e a microbiota mesofílica se torna ativa novamente. Neste estágio, a matéria orgânica já está estabilizada, permanecendo somente aquela de difícil

dégradação. A partir daí, o composto deve passar pela fase de maturação, onde ocorre uma lenta degradação da matéria orgânica remanescente, até que a parte volátil atinja aproximadamente 50% (12).

Os principais fatores que afetam a compostagem são descritos abaixo:

a) *Temperatura* -- é a função da atividade microbiana e pode diminuir, se houver falta de oxigênio ou umidade, bem como excesso de umidade. A diminuição da umidade também é função da temperatura.

b) *Umidade* -- a umidade ótima para máxima eficiência do processo está entre 50 a 60% (em peso). Abaixo de 40% de umidade, a decomposição é aeróbica, mas lenta, enquanto que, acima de 60%, a quantidade de poros livres de água é muito pequena, dificultando a difusão do oxigênio e resultando em anaerobiose.

c) *Aeração* -- a concentração de O₂ necessária para que não haja limitação do processo está em torno de 5 a 10%, nos macroporos. Mesmo havendo uma concentração relativamente alta de O₂ nos macroporos, os microporos podem se encontrar em anaerobiose, dependendo da umidade do material em compostagem (8).

d) *Relação C/N* -- a relação C/N ideal para uma compostagem rápida está entre 25 e 35. Relações menores podem resultar em perdas de NH₃ por volatilização, enquanto que relações maiores resultam em uma compostagem mais lenta.

e) *pH* -- o ótimo está entre 6,0 e 7,5. Valores de pH extremos inibem a atividade microbiana durante o processo de degradação, devendo ser corrigidos de forma a não aumentar os custos do processamento.

f) *Tamanho das partículas* -- a redução do tamanho das partículas pode aumentar a superfície para o ataque microbiano. No entanto, o excesso de partículas muito pequenas pode levar à compactação e à formação de grande quantidade de microporos, favorecendo, conseqüentemente, o desenvolvimento de condições anaeróbicas. A compostagem de resíduos semi-sólidos, como o lodo de sistemas de tratamento biológico, exige a mistura com um material de enchimento qualquer, necessário para assegurar estrutura e porosidade adequadas para a realização do processo. Dentre os materiais biodegradáveis, é comum a utilização de cavacos de madeira ou casca de árvore, devendo ser reposta a quantidade degradada a cada reutilização (9, 17). Também podem ser utilizados materiais de enchimento não biodegradáveis, tais como, esferas porosas de argila, plástico, borracha, etc. (3).

A utilização do composto na agricultura é extremamente vantajosa, funcionando como um fertilizante nitrogenado de liberação lenta com ação residual prolongada, de forma que a eficiência de absorção pelas plantas aumenta,

resultando em produtividades maiores, quando comparada aos fertilizantes nitrogenados solúveis (18). Sua utilização pode aumentar a retenção de água no solo (5).

O benefício do composto pode ser relativamente maior em países em desenvolvimento, onde existe falta de fertilizantes químicos, ou seu preço é elevado, e onde a degradação do solo é intensa (7).

BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

A biodigestão anaeróbia de materiais orgânicos deve ser encarada não só como uma forma alternativa de obtenção de energia pela produção de biogás, mas, principalmente, como um processo para o tratamento e estabilização de resíduos agrícolas e industriais, com o objetivo de reciclar os nutrientes para a agricultura.

O biogás produzido nesse processo é uma mistura de gases que contém CH₄, representando aproximadamente 50% ou mais do volume; CO₂, normalmente menos de 50%; vapor de água, aproximadamente 5%; e menos de 1% de H₂S e NH₃. A composição do biogás é função do material a ser digerido, da temperatura no interior do biodigestor e do tempo de retenção (2, 13).

A produção de CH₄ é o resultado de um processo microbiológico estritamente anaeróbico, onde interagem diferentes populações de uma microbiota bastante complexa; o modelo atualmente aceito pode ser visto na figura 3 (14). O processo global de metanogênese pode ser dividido em três estádios:

- a) fermentativo (acidogênico);
- b) intermediário;
- c) metanogênico.

No estágio fermentativo, populações de bactérias capazes de produzir exoenzimas hidrolíticas degradam os grandes polímeros da matéria orgânica complexa a moléculas solúveis de baixo peso molecular, normalmente seus respectivos monômeros (Figura 3, a1 e a3). Essas moléculas podem ser absorvidas e metabolizadas pelas próprias bactérias que as produziram, ou por populações que não são capazes de hidrolisar os grandes polímeros (Figura 3, a2).

A atividade dessas bactérias fermentativas resulta no acúmulo de uma série de produtos finais reduzidos, tais como: ácidos graxos voláteis de 2 a 5 átomos de carbono, etanol (outros álcoois e cetonas) e ácidos orgânicos (normalmente láctico). Devido à grande produção de ácidos orgânicos, este estágio é chamado acidogênico, existindo um acúmulo de íons H⁺ livres e, conseqüentemente, uma acidificação do meio.

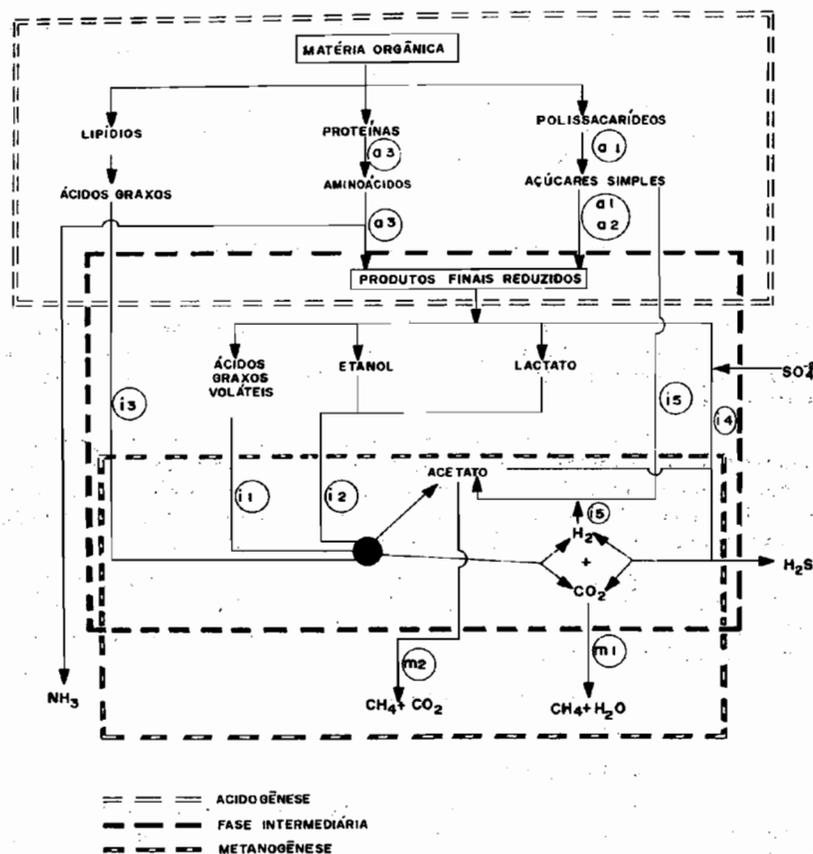
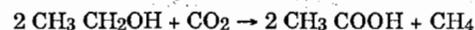
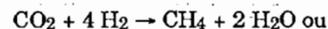


Figura 3. Esquema do processo global de metanogênese (Nyns (14)).

No estágio intermediário, determinadas populações bacterianas servem como ligação entre as fermentativas e as metanogênicas, algumas competindo com o primeiro grupo e outras com o segundo. Todos esses grupos de bactérias (Figura 3, i1, i2, i3, i4, i5) são acetogênicas produtoras de hidrogênio obrigatórias e vivem em simbiose com as hidrogenotróficas (Figura 3, m1), fazendo com que a pressão parcial de H_2 permaneça extremamente baixa.

Quando existe sulfato no meio, as bactérias sulfato-redutoras (Figura 3, i4) podem tornar-se importantes, competindo com bactérias acetogênicas produtoras de H_2 obrigatórias pela obtenção de ácidos graxos voláteis, etanol e lactato e produzindo H_2S (gás sulfídrico).

Um outro grupo de bactérias hidrogenotróficas (Fig. 3, i5), as chamadas homoacetogênicas, são capazes de reduzir o CO_2 a acetato somente (quimiolitotróficas) e/ou de competir com as fermentativas pela glicose (quimiorganotróficas). Esse grupo pode competir também com as metanogênicas pelo H_2 e CO_2 , como, por exemplo, *Methanosarcina barkeri* e *Methanococcus mazei*, que são capazes de realizar as seguintes reações:



O terceiro estágio é o metanogênico propriamente dito. Nele, as bactérias metanogênicas, que não são bactérias verdadeiras e sim *Archaeobacteria*, que talvez sejam os microrganismos mais primitivos na escala evolutiva (Figura 4), metabolizam unicamente o H_2 e CO_2 a CH_4 (Figura 3, m1) e, eventualmente, o acetato a CH_4 e CO_2 (Figura 3, m2). O primeiro grupo de bactérias, chamado hidrogenotrófico, é constituído de quimiolitotróficas, e o segundo, chamado acetoclástico, é constituído de quimiorganotróficas. A classificação taxonômica das bactérias metanogênicas pode ser vista no quadro 3. Esse estágio é alcalinizante, uma vez que há consumo de íons H^+ (10).

A aplicação tecnológica do processo de metanogênese é a produção de biogás em biodigestores, os quais podem variar muito em forma, tamanho e tipo de operação. Alguns tipos de biodigestores podem ser vistos na figura 5.

Os fatores que afetam a produção de biogás são descritos abaixo:

Temperatura -- existem duas faixas ótimas onde ocorre a metanogênese: uma mesofílica (entre 30 e 37^o C), mais comum, e outra termofílica (entre 50 e 65^o C). Os biodigestores devem ser construídos com materiais com bom isolamento térmico, para evitar variações bruscas de temperatura, sendo que, em alguns casos, há necessidade de se utilizar parte do biogás produzido para aquecer o biodigestor.

pH -- o ótimo para a metanogênese está na faixa de 7 a 8. Alguns tipos de substrato podem levar à acidificação excessiva do meio, diminuindo a taxa de produção de CH_4 , como, por exemplo, a polpa de café.

Anaerobiose -- as bactérias metanogênicas são estritamente anaeróbias e morrem na presença de O_2 . O dimensionamento do biodigestor e a atividade das bactérias anaeróbias facultativas do estágio fermentativo devem ser

tais que a taxa de difusão de O₂ no meio seja menor do que a taxa de absorção por essas bactérias, de modo que o biodigestor não precise ser necessariamente isolado da atmosfera.

Relação C/N -- a relação entre o C e N prontamente assimiláveis deve estar na faixa entre 16 e 19, para máxima produção de CH₄. O N é necessário para o crescimento celular; no entanto, excesso de N favorece a formação de NH₃.

Quadro 3. Taxonomia das bactérias metanogênicas (Kuster & Niese (11), Hungate (10))

| Ordem ⁽¹⁾ | Família | Gênero..... | Espécies | Morfologia e composição da parede celular |
|----------------------|-------------------------|---|--|--|
| Methanobacteriales | Methanobacteriaceae | <i>Methanobacterium</i> | <i>M. formicum</i> <i>M. bryantii</i> <i>M. thermoautotrophicum</i> | Bastonetes longos; pseudomureína |
| | | <i>Methanobrevibacter</i> | <i>M. ruminantium</i> <i>M. arboriphilus</i> <i>M. smithii</i> | Bastonetes curtos; pseudomureína |
| Methanococcales | Methanococaceae | <i>Methanococcus</i> | <i>M. vannielli</i> <i>M. voltae</i> <i>M. mazei</i> <i>M. thermolithotrophicus</i> | Cocos regulares a irregulares; subunidades protéicas c/ traços glucosamina |
| Methanomicrobiales | Methanomicrobiaceae | <i>Methanomicrobium</i> | <i>M. mobile</i> | Bastonetes curvos e curtos; subunidades protéicas |
| | | <i>Methanogenium</i> | <i>M. cartaci</i> <i>M. marisnigri</i> <i>M. thermophilicus</i> | Cocos muito irregulares, subunidades protéicas |
| | <i>Methanospirillum</i> | <i>M. hungatei</i> | Bastonetes longos e curvos; subunidades protéicas c/ bainha externa | |
| | Methanosarcinaceae | <i>Methanosarcina</i> <i>Methanotherix</i> | <i>M. barkeri</i> <i>M. soehngenii</i> | Cocos irregulares; heteropolissacarídeos |
| Methanoplanales | Methanoplanaceae | <i>Methanoplanus</i> | <i>M. limicola</i> | |

(1) Bactérias não classificadas: *Methanobolus tindarius*, *Methanoplasma elizabethii*.

Micronutrientes -- quantidades de Fe²⁺ acima de 2 mM são necessárias para máxima atividade das bactérias acetoclásticas. Cu, Ni, Co e Mo também são necessários. A presença de H₂S pode levar à precipitação de Fe²⁺, principalmente.

Metais Pesados -- excesso de Zn, Ni, Pb, Cd e Cu pode ser tóxico às bactérias metanogênicas. Esses metais estão em equilíbrio com o sulfeto, o qual pode torná-los insolúveis e anular seu efeito tóxico.

Antibióticos -- quando presentes na ração animal, podem inibir o desenvolvimento das bactérias metanogênicas, se o esterco dos animais alimentados com essa ração for utilizado no biodigestor.

APLICAÇÃO NO SOLO

A utilização do solo como receptor de resíduos orgânicos requer o conhecimento das transformações químicas e bioquímicas que os mesmos podem sofrer. Os resíduos vegetais e animais são degradados para se tornarem parte do solo, na forma de húmus, possibilitando a reciclagem da matéria orgânica para aproveitamento vegetal. Os resíduos podem ser aplicados em solos cultivados ou não. No primeiro caso, deve haver um manejo adequado para que a produtividade seja máxima. Em ambos os casos, alguns aspectos devem ser considerados para que não haja problemas de degradação e poluição do solo (1, 11).

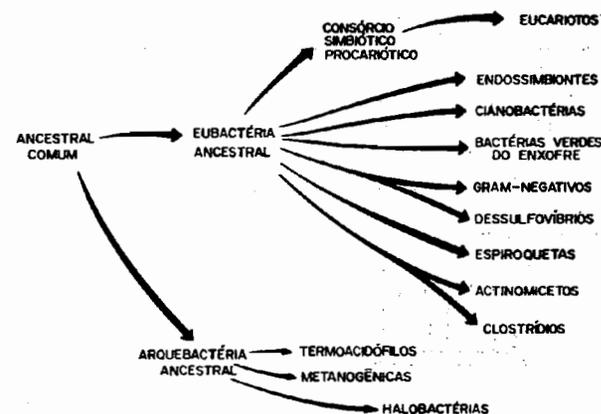
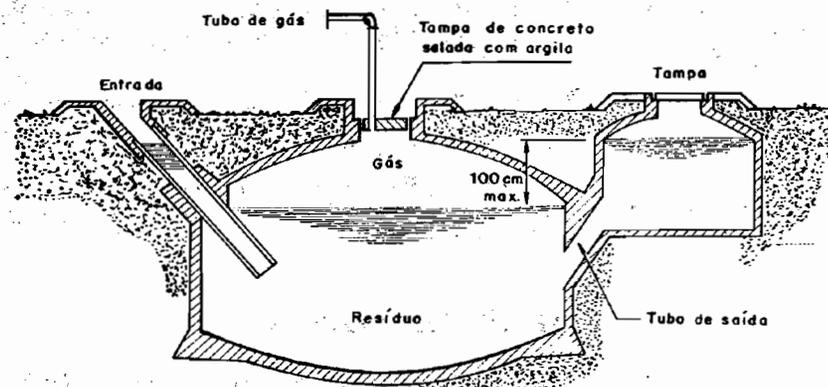


Figura 4. Relações evolucionárias dos procariotos (10).

A. Tipo: chinês pressurizado



B. Tipo indiano

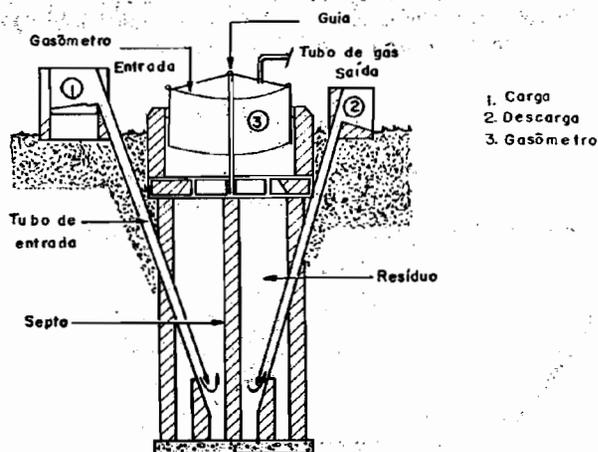


Figura 5. Biodigestores dos tipos Chinês e Indiano (2).

Características do Resíduo -- o resíduo não deve possuir uma concentração de metais pesados maior do que aquela na qual, após sua aplicação, a concentração no solo não ultrapasse os limites aceitáveis pela legislação; não possuir excesso de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} ; ser biodegradado dentro de um período de tempo razoável, não formando substâncias tóxicas; possuir relação C/N ideal; ter sua taxa de aplicação adequada às características físico-químicas do solo para que não haja lixiviação e contaminação do lençol freático.

Características do Solo -- o solo deve possuir características físicas que permitam uma boa drenagem e aeração; e características químicas que permitam adsorção dos nutrientes contidos no resíduo ou resultantes de sua biodegradação e da adsorção e/ou precipitação de metais pesados.

Os resíduos são aplicados na superfície do solo, podendo ou não serem incorporados. Os benefícios dessa aplicação estão relacionados com o aumento da fertilidade do solo, através do aumento da concentração de nutrientes, maior retenção de água e melhor estruturação, entre outros fatores.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York, John Wiley & Sons, 1977. p.467.
2. ANÔNIMO. Guidebook on biogas development. New York, United Nations Publ., 1980.
3. BERTOLDI, M. de; CITERNESI, U. & GRISELLI, M. Microbial populations in compost processes. In: GOLDSTEIN, J. ed. Composting: Theory and practice for city, industry and farm, Emmaus, J.G. Press, 1981. p.26-33.
4. BOCKRIS, J.O.M. Environmental chemistry. In: BOCKRIS, J.O.M., ed. Environmental chemistry. New York, Plenum Press, 1977. p.1-18.
5. CARDOSO, C.O.N. & TOLEDO, A.C.D. de. Compostagem de resíduos da indústria de açúcar e álcool. Reunião Técnica Agrônômica: "Manejo da adubação na cultura da cana-de-açúcar". Centro de Tecnologia Copersucar, abril, 1984. p.48-52.
6. CHAKRABARTY, A.M. Genetic Engineering and Problems of Environmental Pollution. In: REHM, H-J. & REED, G. eds., Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vols., Microbial Degradations, SCHONBORN, W. , (editor). Germany, VHC Verlagsgesellschaft, 1986. p.515-530. v.8.
7. COLACICCO, D. Economic aspects of composting. Biocycle, Emmaus, 23(5):26-30, 1982.
8. FINSTEIN, M.S.; MILLER, F.C. & STROM, P.F. Waste Treatment Composting as a Controlled System. In: REHM, H-J. & REED, G. eds. Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vols., Microbial Degradations, SCHONBORN, W. , (editor). Germany, VHC Verlagsgesellschaft, 1986. p.363-398. v.8.

9. FRANKOS, N.H.; GOUIN, F. & SIKORA, L.J. Using woodchips of specific species in composting. *Biocycle*, Emmaus, 23(3):38-40, 1982.
10. HUNGATE, R.E. Biochemistry and microbiology of anaerobic digestion. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 15(4):278-292, 1984.
11. KUSTER, E. & NIESE, G. Dumping of refuse and sludges. In: REHM, H.J. & REED, G., eds. *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vols., Microbial Degradations*, SCHONBORN, W., (editor). Germany, VHC Verlagsgesellschaft, 1986. p.349-362. v.8.
12. LOEHR, R.C. *Agricultural waste management - problems, processes and approaches*. New York, Academic Press, 1974. p.576.
13. MAGALHÃES, A.P.T. *Biogás: um projeto de saneamento urbano*. São Paulo, Nobel, 1986. p.120.
14. NYNS, E.J. *Biomethanation Process*. In: REHM, H.J. & REED, G. eds. *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vols., Microbial Degradations*, SCHONBORN, W., (editor). Germany, VHC Verlagsgesellschaft, 1986. p.207-267. v.8.
15. OVERCASH, M.R. & PAL, D. *Design of land treatment systems for industrial wastes - theory and practice*. Ann Arbor, Sci. Publ. Inc., 1979. p.684.
16. PARR, J.F. & WILSON, G.B. *Recycling organic wastes to improve soil productivity*. Hort. Science, Alexandria, 15(2):162-166, 1980.
17. SHEA, T.B.; BRASWELL, J. & COKER, C.S. *Bulking agent selection in sludge compost facility design*. In: *Composting: theory and practice for city, industry and farm*. GOLDSTEIN, J., Emmaus, J.G. Press, 1981. p.125-128.
18. TESTER, C.F. & PARR, J.F. *Intensive vegetable production using compost*. *Biocycle*, Emmaus, 24(1):34-36, 1983.
19. VERSTRAETE, W. & VAERENBERGH, E. von. *Aerobic Activated Sludge*. In: REHM, H-J & REED, G. eds., *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vols., Microbial Degradations*, SCHONBORN, W., (editor), Germany, VHC Verlagsgesellschaft, 1986. p.43-112. v.8.

O CICLO DO NITROGÊNIO

Reynaldo L. Victoria⁽¹⁾, Marisa C. Piccolo⁽²⁾
& Álvaro A.T. Vargas⁽²⁾

INTRODUÇÃO

De uma maneira geral, todos os compostos de nitrogênio encontrados na natureza estão, de alguma forma, interligados, formando o que é comumente conhecido por ciclo do nitrogênio. Um esquema geral deste ciclo pode ser visto na figura 1.

Uma grande parte deste ciclo se passa principalmente na camada superficial dos solos, com vários mecanismos de entrada e saída de nitrogênio, sempre acompanhados de transformações bastante complexas, formando uma sucessão de reações de natureza principalmente bioquímica (25, 26). De uma certa forma, o homem, com a introdução de técnicas agrícolas modernas, tem a capacidade de interferir em praticamente todos os processos deste ciclo. O estudo e conhecimento mais aprofundado dos fatores que controlam estes processos reveste-se, então, de grande importância prática, para que possamos utilizar as técnicas agrícolas de maneira racional, sem perturbar o equilíbrio natural do ambiente em que vivemos.

As principais fontes de nitrogênio para o solo são: materiais vegetais (como restos de cultura, adubo verde ou serapilheira) ou de natureza animal, fertilizantes industriais, sais de amônio e nitratos trazidos pela precipitação, e a fixação biológica de nitrogênio realizada por certos microrganismos. Destas, as mais importantes são os fertilizantes (fixação industrial) e a fixação biológica. A entrada de nitrogênio via precipitação se deve a fenômenos ionizantes,

⁽¹⁾ Departamento de Física e Meteorologia ESALQ/USP, Caixa Postal 9, CEP 13400, Piracicaba SP.

⁽²⁾ Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

como as radiações cósmicas e os relâmpagos, que podem fornecer a energia necessária para a reação do N_2 com o oxigênio ou com o hidrogênio da água. A fixação industrial de N tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, principalmente devido ao aumento do uso de insumos na agricultura. Antes da fabricação em larga escala de fertilizantes, e do aumento do cultivo de variedades de leguminosas com alto potencial de fixação biológica de N_2 , a quantidade de N retirada da atmosfera por processos naturais de fixação era quase equilibrada em relação à quantidade devolvida à atmosfera pelos processos de volatilização e desnitrificação (11). Nos dias de hoje, já não podemos estar seguros de que os processos de volatilização e desnitrificação sejam equivalentes aos de fixação. Pela sua grande importância, a fixação biológica de nitrogênio será tratada em capítulos à parte. As perdas de N se devem principalmente à remoção pelas culturas, à erosão, à volatilização na forma de amônia e à desnitrificação, na forma de óxidos de N e N_2 . Neste capítulo, será discutido somente o processo de desnitrificação, devido à sua natureza biológica. Deixamos de discutir os demais processos de perda que são controlados por processos mecânicos ou físico-químicos.

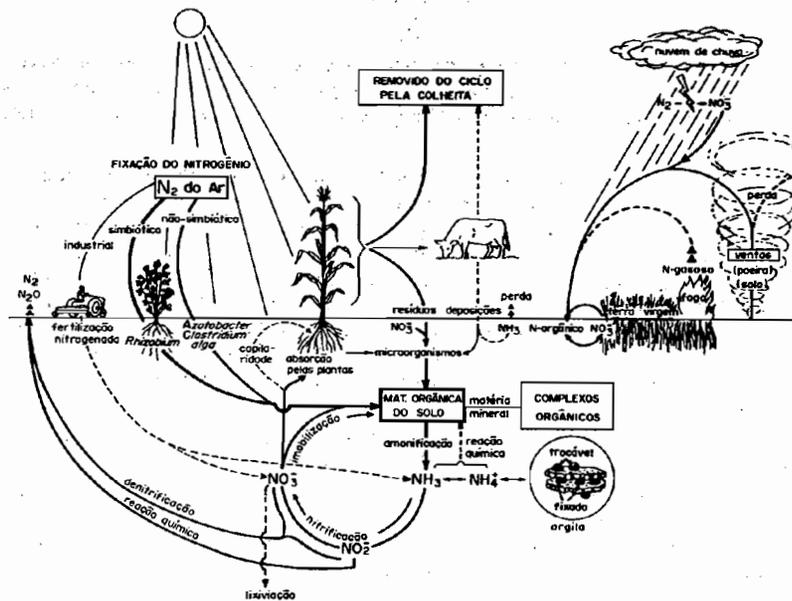


Figura 1. Ciclo do nitrogênio no solo. Reimpressão da figura 1, Stevenson (26), com permissão da American Society of Agronomy Inc, Crop Science Society of America Inc. e Soil Science Society of America Inc.

MICROORGANISMOS DO SOLO

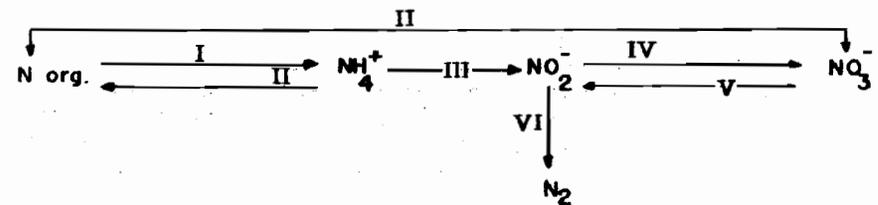
O ciclo interno de N no solo é o controlador da disponibilidade de nitrogênio para a nutrição das plantas. Apesar de sua grande importância, nota-se que nas últimas décadas, pouca atenção tem sido dada aos estudos dos processos de transformação de N nos solos, principalmente no Brasil. A maior parte dos esforços de pesquisa tem sido voltada para o estudo da fixação biológica de N_2 , e pouca atenção tem sido dada aos processos microbianos de transformação de N nos solos. A maioria dos processos de transformação de N no solo é mediada por microrganismos. Procuraremos neste tópico dar uma rápida visão das características dos principais grupos de microrganismos envolvidos nestes processos. Uma visão mais profunda foge aos objetivos deste capítulo.

Dos microrganismos do solo, os mais importantes do ponto de vista das transformações de N são os fungos e as bactérias. Os actinomicetos e as algas, embora também participem dos mesmos, têm importância relativamente menor. Os fungos, por não possuírem clorofila, dependem de carbono orgânico pré-formado para suas sínteses celulares. Desta maneira, geralmente usam amônia ou nitrato como fonte de N, mas também metabolizam proteínas, ácidos nucléicos e outros complexos orgânicos. A capacidade de utilizar substâncias protéicas é característica de fungos que mineralizam frações nitrogenadas orgânicas, produzindo amônia ou outros compostos nitrogenados simples, ao mesmo tempo liberando carbono para síntese celular.

As bactérias constituem também um grupo de atuação destacada nos processos de transformação de N nos solos. Atuam na decomposição da matéria orgânica e são as principais responsáveis pelos processos de nitrificação e desnitrificação, como será visto adiante.

OS PROCESSOS DE TRANSFORMAÇÕES DE NITROGÊNIO NO SOLO

A seqüência de transformações pelas quais passa o nitrogênio no solo pode ser visualizada no esquema seguinte:



O processo de transformação de N orgânico em nitrato é chamado de **mineralização** e é composto pelos processos de **amonificação** (I) e **nitrificação** (III e IV). Nesta seqüência, o passo limitante é a amonificação, mediada por microrganismos quimiorganotróficos. A nitrificação ocorre geralmente de maneira mais rápida, mediada por microrganismos quimiolitotróficos especializados. A **imobilização** (II) é caracterizada pela utilização do N mineral disponível durante o metabolismo microbiano, ocorrendo simultaneamente à mineralização. A **desnitrificação** (V e VI) é um processo de respiração anaeróbia que resulta em perdas gasosas de nitrogênio (Ver figura 2).

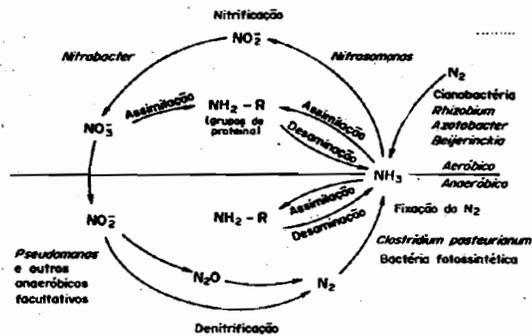


Figura 2. Ciclo de oxidação-redução para o nitrogênio. Os estados de oxidação para os compostos-chave deste ciclo são: N-orgânico (R-NH₂) = -3; NH₃ = -3; N₂ = 0; N₂O = +1; NO₂ = +3; NO₃ = +5. Reimpressão da p.643, Brock & Madigan (6), Biology of Microorganisms, 6.ed., 1991, com permissão da Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

AMONIFICAÇÃO

É o processo de conversão de N orgânico em amônio, sendo o passo limitante da mineralização. É relativamente lento e não requer a presença de microrganismos específicos para ser levada a cabo. Muitos microrganismos quimiorganotróficos são capazes de efetuar esta transformação, tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Neste último caso, as taxas de transformação são ainda mais lentas. A formação de amônio é tipicamente o resultado de um processo de excreção de N celular durante a decomposição de formas orgânicas de N. Sendo o primeiro produto resultante da decomposição de matéria orgânica, o amônio foi, a princípio, bastante utilizado por microbiologistas para quantificação das taxas de mineralização. Foi, porém, logo observado que os resultados obtidos eram, na maioria das vezes, contraditórios e de difícil interpretação (1). Mesmo a produção de nitrato, apesar de sujeita a menores críticas, pode levar a interpretações

errôneas dos resultados. O procedimento mais aconselhável é, então, a determinação de todas as formas de N mineral, estudando-se a mineralização como um todo. Esta é a principal razão pela qual poucos são os trabalhos específicos sobre amonificação que podem ser encontrados na literatura. Outro fator complicador na interpretação dos resultados, e que deve aqui ser lembrado, é o fato de que a formação de N mineral em solos é sempre acompanhada pelo processo reverso, a imobilização em formas orgânicas durante o metabolismo celular. A medida da produção de N mineral, calculada pela diferença entre as quantidades determinadas em dois tempos diferentes, é então, na realidade, o resultado líquido destes processos opostos e não a taxa absoluta de produção (2). Além disso, os processos de lixiviação e desnitrificação também têm papel importante no controle da quantidade de N mineral presente em um solo, em um dado instante. Dessa maneira, embora a produção de N mineral possa ser grande, a taxa calculada pode ser nula, ou até mesmo negativa (1). Percebe-se, então, que as maiores dificuldades encontradas para os estudos das transformações de N nos solos são de natureza metodológica, que podem, pelo menos em parte, ser contornadas pelo uso de compostos marcados com ¹⁵N.

Uma vez disponível no solo, o amônio pode seguir vários caminhos:

- Pode ser absorvido em quantidades razoáveis por alguns dos próprios amonificados. ou por outros microrganismos capazes de utilizar este composto;
- Pode ser absorvido por vegetais superiores, que, em sua grande maioria, têm a capacidade de sorver diretamente esta forma de N;
- Pode ser adsorvido pelos minerais de argila, passando a fazer parte do complexo de troca do solo;
- Pode ser fixado no solo pela sua inclusão entre as lâminas dos minerais de argila do tipo 2:1, tornando-se, desta maneira, indisponível para as plantas;
- Pode ser oxidado a nitrato por certas espécies de bactérias quimiolitotróficas que o utilizam como fonte de energia, iniciando assim o processo de nitrificação.

NITRIFICAÇÃO

A nitrificação é um processo de natureza estritamente biológica, descoberto por Winogradsky entre 1889-1890, com o isolamento de "bactérias nitrificadoras". Pode ocorrer nos mais variados ambientes e é de vital importância para a produtividade primária, ciclagem de nutrientes, tratamento de resíduos e qualidade de águas e da atmosfera (25). É definido como a oxidação de amônio a nitrato mediada por microrganismos que podem ser quimiolitotróficos ou quimior-

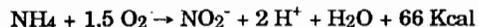
ganotróficos. Os primeiros são os principais responsáveis pela nitrificação em solos, sendo os únicos diretamente ligados à nitrificação em ambientes naturais. São bactérias gram negativas da família Nitrobacteriaceae, que são capazes de retirar a energia necessária para seu crescimento da oxidação de N amoniacal ou nitroso. Os diferentes gêneros e espécies envolvidos nesses processos estão relacionados no quadro 1.

Quadro 1. Microrganismos quimiolitotróficos, responsáveis pela nitrificação do amônio no solo (Schmidt (24), Focht (12) e Focht & Verstraete (12))

| Espécie | Crescimento em cultura pura | | Tempo para geração |
|---------------------------------|---|----------|--------------------|
| | Temperatura | pH | |
| | °C | | horas |
| | Oxidação do NH_4^+ a NO_2^- | | |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | 5-40 | 5,8-9,5 | 12,7 |
| <i>Nitrospira briensis</i> | 25-30 (ótimo) | 7,5-8,0 | 20,9 |
| <i>Nitrosolobus multiformis</i> | 15-30 | 6,0-8,2 | 16,0 |
| <i>Nitrosovibrio tenuis</i> | ... | ... | ... |
| | Oxidação do NO_2^- a NO_3^- | | |
| <i>Nitrobacter winogradskyi</i> | 5-40 | 5,7-10,2 | 15,1 |
| <i>Nitrobacter agilis</i> | ... | ... | 13,2 |

A nitrificação ocorre em duas etapas:

a) **Nitrificação:** que é a transformação de amônio a nitrito, levada a efeito por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, através da seguinte reação:



b) **Nitratação:** que é a transformação de nitrito a nitrato, levada a efeito por bactérias do gênero *Nitrobacter*, através da reação:



Alguns microrganismos quimiorganotróficos, como, por exemplo, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Achromobacter*, são capazes de efetuar a nitrificação, acumulando NO_2^- em meio contendo NH_4^+ . O fungo *Aspergillus flavus* forma NO_3^- na presença de NH_4^+ . Entretanto, embora exista a comprovação, em meio artificial, de que estes microrganismos podem oxidar o NH_4^+ , não existem evidências de que o mesmo possa ocorrer no solo, em condições naturais.

Junto com a amonificação, a nitrificação exerce papel fundamental nos mecanismos de perdas de N dos solos, principalmente os de perda por via gasosa. A adição de uréia ou de fertilizantes amoniacais em um solo pode induzir a variações de pH (19). Após a hidrólise da uréia, a amônia formada é imediatamente hidrolisada com produção de hidroxila e consequente aumento do pH (14):



Nos locais de aplicação do fertilizante, o pH pode chegar a 10 (19), predominando neste caso em solução a forma NH_3 , que pode volatilizar neste pH. Com a sequência do processo, o NH_4^+ é oxidado a NO_3^- (nitrificação), com a produção líquida de dois íons H^+ e consequente abaixamento do pH. O nitrato formado, conforme as condições, pode ser perdido por lixiviação ou desnitrificação. Como conclusão, a adição de uréia a um solo deve causar um aumento inicial do pH, que decresce para valores abaixo do original após completa nitrificação do amônio, e caso não haja perdas substanciais do N (18). Em solos com boa aeração e não fertilizados, a oxidação do nitrito é mais rápida que a do amônio, não havendo, portanto, acúmulo de nitrito na maioria dos solos. Como o NO_2^- serve de precursor na formação de nitrosaminas, e sendo ambos os compostos considerados como agentes carcinogênicos, a rapidez com que o nitrito é oxidado a NO_3^- diminui seu impacto nocivo sobre os seres vivos.

Pela importância que tem para a nutrição de plantas cultivadas, o controle das concentrações de amônio e nitrato em solos, pela utilização de fertilizantes de liberação lenta e inibidores de urease e da nitrificação, tem recebido atenção especial nos últimos anos por parte de pesquisadores do mundo inteiro. Como exemplo de fertilizante de liberação lenta, podemos citar a uréia recoberta com enxofre, cera impermeabilizante, ou outro material que lhe confira a propriedade de se solubilizar lentamente no solo. Também são bastante utilizados, especialmente em culturas de arroz irrigado, os supergrânulos de uréia (péletes de 5 a 7 mm de diâmetro, que têm a sua dissolução retardada).

Os inibidores da nitrificação podem ocorrer naturalmente, como certos aminoácidos e bases nitrogenadas liberadas durante a decomposição da matéria orgânica, e substâncias liberadas pelas raízes de algumas plantas. O uso de inibidores artificiais, tais como N-SERVE e agrotóxicos (fungicidas, fumigantes, herbicidas, etc.), tem recebido atenção especial de pesquisadores, alguns deles se mostrando como potentes inibidores da nitrificação em solos (3, 20, 21, 23). Os resultados obtidos são ainda controversos, sendo alguns deles benéficos (14, 15, 16, 18, 21, 27), ou adversos, com aumento das perdas de N por volatilização de amônia (8, 9, 17, 22). Em princípio, a utilização de inibidores de nitrificação tinha como objetivo principal, a redução de perdas por lixiviação de nitrato, mas sabe-se hoje que certos inibidores são capazes de reduzir perdas gasosas via desnitrificação química e biológica (18).

Fatores que afetam a nitrificação

Os principais fatores que podem influir na nitrificação em solos são:

a) **Aeração:** sendo um processo de oxidação estritamente aeróbio, a nitrificação depende da presença de oxigênio. Desta maneira, qualquer procedimento capaz de aumentar a aeração de um solo acelerará, até certo ponto, a taxa de nitrificação. Em ambientes anaeróbios, a nitrificação mediada por microrganismos quimiolitotróficos não ocorre.

b) **Temperatura:** a temperatura mais favorável para o processo de nitrificação se situa na faixa entre 26 e 32^o C, cessando acima de 51^o C (7).

c) **Umidade:** além de estar indiretamente associada com a aeração do solo, a umidade exerce também influência direta na nitrificação, que pode ser retardada por condições extremas de umidade, quer reduzidas, quer saturadas. O teor ótimo de umidade para a nitrificação pode ser considerado, em geral, o mesmo que o exigido para o crescimento ótimo de vegetais superiores.

d) **Calagem:** a calagem estimula a nitrificação em solos ácidos. O processo de oxidação exige abundância de bases trocáveis, o que explica em parte a baixa taxa de nitrificação encontrada em solos minerais ácidos (6). Os microrganismos responsáveis pela nitrificação são também sensíveis a valores baixos de pH e requerem um pH na faixa de 7,0-7,6 para atingir o seu crescimento ideal. Em solos ácidos, a população destes grupos, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, é extremamente baixa, e sua atividade muitas vezes sequer é detectada. Isto tem sugerido a possibilidade da nitrificação causada por microrganismos quimiorganotróficos, adaptados às condições de acidez do solo. Entretanto, mesmo em solos ácidos, podem existir *micro-habitats* a pH elevado, onde a acidez não é o fator limitante para a nitrificação.

e) **Fertilizantes:** a aplicação de quantidades elevadas de fertilizantes amoniacais a solos alcalinos inibe a segunda fase da nitrificação (5). Nestas condições, a amônia formada é tóxica a *Nitrobacter*, sem exercer influência prejudicial a *Nitrosomonas*. Como resultado, quantidades tóxicas de nitrato poderão se acumular no solo.

f) **Relação C/N:** a relação C/N de materiais vegetais incorporados a um solo tem influência marcante nas transformações de N, em especial na nitrificação. Relações C/N elevadas causam a imobilização do N mineral, pelo menos temporária, cessando a nitrificação por falta de substrato e podendo causar deficiência de N para os vegetais superiores. Tomemos, como exemplo hipotético, um solo cultivado e que ofereça condições favoráveis à nitrificação. A presença de nitrato se encontra em nível razoavelmente grande e a relação C/N do solo é baixa. Os organismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica se encontram em nível reduzido de atividade e a produção de CO₂ é mínima. Um exemplo desse efeito pode ser visualizado na figura 3.

O CICLO NO NITROGÊNIO.

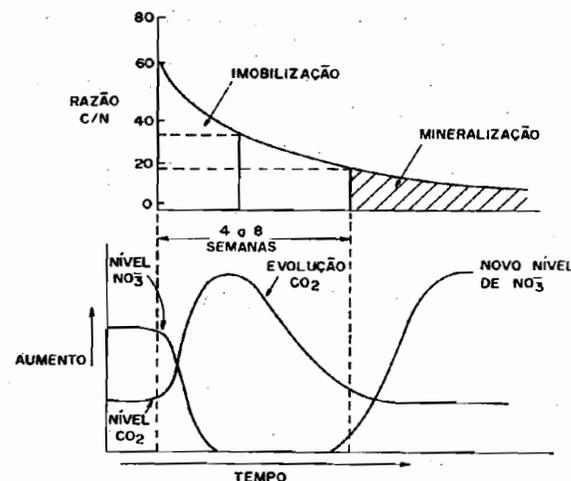


Figura 3. Transformações nos níveis de nitrato atendendo à decomposição de resíduos orgânicos no solo. Reimpressão da figura 5.5, Stevenson (25) com permissão da John Wiley & Sons, Inc.

Se a este solo adicionarmos quantidades elevadas de resíduos orgânicos com alta relação C/N, a microbiota quimiorganotrófica (bactérias, fungos e actinomicetos) que atua na decomposição da matéria orgânica torna-se ativa, multiplicando-se rapidamente e produzindo CO₂ em grandes quantidades. Nestas condições, o nitrato praticamente desaparece do solo, o mesmo devendo ocorrer com o amônio, caso presente. Durante um certo período, predominam condições de pouca ou nenhuma disponibilidade de N mineral para os vegetais superiores. Com a continuidade do processo de decomposição, diminui a relação C/N do solo, uma vez que o carbono está sendo perdido na forma de CO₂ e o N sendo conservado pela formação da massa celular microbiana. Esta situação continua até que os resíduos vegetais atinjam uma relação C/N em torno de 20. Neste ponto, a atividade de microrganismos decompositores, pela falta de C facilmente oxidável, diminui gradualmente, e também a formação de CO₂. O N deixa de ser limitante para os processos microbianos, passando, então, a haver liberação de N mineral. A nitrificação volta a ser ativa, produzindo nitrato em níveis até superiores às condições originais.

Da mesma forma que o amônio, também o nitrato, uma vez disponível no solo, poderá seguir vários caminhos:

a) Ser absorvido pelas plantas. O NO_3^- é o íon nitrogenado absorvido preferencialmente pela maioria das plantas cultivadas.

b) Ser reutilizado pela atividade microbiana do solo, caso ocorram novas condições favoráveis à imobilização.

c) Sendo um íon bastante móvel no solo, em condições de alta umidade e fluxo descendente de água, poderá ser lixiviado.

d) Ocorrendo condições de baixa concentração de oxigênio, poderá ser perdido por desnitrificação.

IMOBILIZAÇÃO

O termo imobilização refere-se a qualquer mecanismo que contribua para um decréscimo do nitrogênio mineral disponível no solo. Pode, portanto, incluir processos biológicos (como a assimilação por microrganismos e conversão para formas orgânicas) e não biológicos (como a fixação de amônio em certos tipos de argilas). É um processo que ocorre simultaneamente às outras transformações de N no solo, sendo a sua quantificação metodologicamente difícil. O uso de compostos marcados com o isótopo estável ^{15}N pode contornar em parte estas dificuldades (4). Vários são os fatores que podem afetar o processo de imobilização biológica de N em um solo:

a) **Temperatura:** a influência da temperatura na imobilização de N pode ser vista na figura 4, que mostra as mudanças no N inorgânico total e marcado, em função do tempo e da temperatura, em um solo franco-argiloso ao qual foram adicionados 1% de palha e 100 ppm de sulfato de amônio marcado com ^{15}N .

Pode ser observado que a quantidade total de N eventualmente imobilizada não é afetada de maneira marcante pela temperatura, tanto para N total, como para N marcado. Porém, as taxas de imobilização, medidas pelo coeficiente angular inicial das curvas de mudança no N inorgânico, são fortemente afetadas, sendo que as maiores taxas estão associadas a temperaturas mais altas. A mineralização do N marcado (o início da mineralização está associado com os pontos de inflexão das curvas) é muito menor que a observada para o N total, indicando que o N mineralizado é derivado preferencialmente de fontes nativas.

b) **Relação C/N:** como visto anteriormente, a relação C/N de resíduos orgânicos adicionados a solos é de fundamental importância no controle da quantidade de N mineral disponível para as plantas. Resíduos com alta relação C/N levam a uma imobilização do N disponível, que é utilizado pelos microrganismos responsáveis pela decomposição (Figura 3).

De uma maneira geral, a relação C/N para a qual a mineralização passa a predominar se situa em torno de 20 nos solos de clima temperado. Poucas

informações existem para solos em nossas condições. O tempo necessário para que ocorra o decréscimo da relação C/N até níveis onde passa a predominar a mineralização depende de fatores como a taxa de adição de resíduo, temperatura e nível de atividade microbiana do solo, etc. Uma estimativa razoável se situa em torno de 4 a 8 semanas após a adição dos resíduos. Portanto, do ponto de vista prático, devem ser evitadas as adições de restos vegetais com alta relação C/N a um solo, na época imediatamente anterior ao plantio de uma cultura. A imobilização que fatalmente deverá ocorrer pode causar deficiências de N na cultura, caso não seja adicionado concomitantemente N mineral ao solo.

DESNITRIFICAÇÃO

A desnitrificação é definida como um processo de respiração anaeróbia levado a efeito por certos microrganismos capazes de utilizar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons em lugar do oxigênio (11, 12). É, portanto,

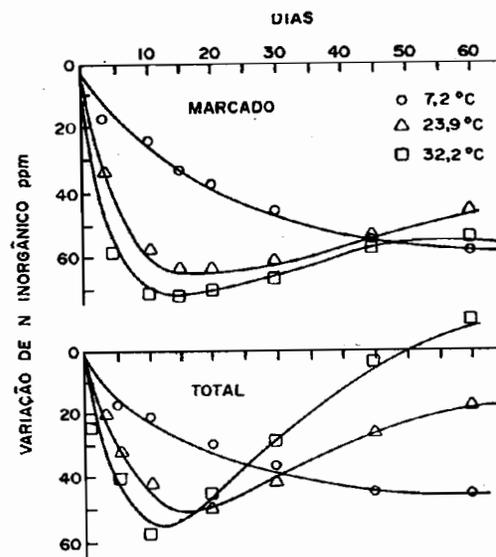
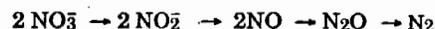


Figura 4. Influência da temperatura na variação do N inorgânico marcado e total em solo franco-argiloso (Broadbent (4)).

um processo de redução bioquímica do nitrato ou nitrito a formas gasosas de N, principalmente N_2 e N_2O . A seqüência de reações é indicada a seguir:



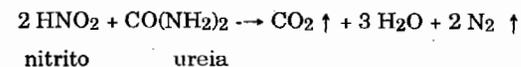
A desnitrificação biológica, juntamente com a volatilização de amônia, constituem as mais importantes vias de perdas gasosas de N do solo.

As perdas de N por desnitrificação são, de uma maneira geral, estimuladas por condições de drenagem deficientes, má aeração, presença de quantidades excessivas de nitrato ou qualquer outra condição que favoreça o aparecimento de condições redutoras no solo. Os microrganismos envolvidos na desnitrificação são bactérias quimiorganotróficas que, sob condições de anaerobiose, são capazes de usar formas oxidadas de N como aceptores finais na respiração. São, portanto, definidos como microrganismos anaeróbios facultativos (Quadro 2). O pH do solo tem influência sobre a forma preferencial de liberação de compostos nitrogenados. Valores de pH acima de 7,0 favorecem a liberação de N_2 , enquanto que valores abaixo de 6,0 favorecem a liberação de óxidos de nitrogênio.

Quadro 2. Gêneros de bactérias capazes de desnitrificar formas oxidadas de nitrogênio (Firestone (11))

| Gênero | Algumas características principais |
|--------------------------|---|
| <i>Alcaligenes</i> | Comumente isolado dos solos |
| <i>Agrobacterium</i> | Algumas espécies são patógenos em plantas (galhas) |
| <i>Azospirillum</i> | Capaz de fixar o N_2 ; comumente associado a gramíneas |
| <i>Bacillus</i> | Termofílico |
| <i>Flavobacterium</i> | Desnitrificador, isolado mais recentemente |
| <i>Halobacterium</i> | Requer alta concentração de sal para crescer |
| <i>Hypomicrobium</i> | Utiliza substrato com 1 átomo de carbono |
| <i>Parococcus</i> | Capaz de crescimento quimiorganotrófico e quimiolitotrófico |
| <i>Propionibacterium</i> | Bactéria fermentadora, capaz de desnitrificar |
| <i>Pseudomonas</i> | Comumente encontrada nos solos |
| <i>Rhizobium</i> | Fixa o N_2 em simbiose com leguminosas |
| <i>Rhodospseudomonas</i> | Bactéria fotossintética |
| <i>Thiobacillus</i> | Geralmente cresce como quimiolitotrófico, oxida o S |

As perdas gasosas resultantes da reação química do nitrito produzido por nitrificadores e/ou desnitrificadores com certos compostos do solo, chamada de quimiodesnitrificação, pode ser relevante em alguns casos. Como exemplo, podemos citar a seguinte reação:



Este processo de perda gasosa é estritamente químico e não depende de condições de anaerobiose no solo.

A grande maioria das pesquisas, onde se procura estabelecer um balanço final do N aplicado a culturas agrícolas, tem demonstrado que cerca de 20 a 30% do N adicionado não são recuperados, sendo presumivelmente perdidos por desnitrificação ou volatilização. A conseqüente prática de tal fato se faz sentir não somente na má utilização de fertilizantes, mas também em problemas ambientais, tais como a redução da camada de ozônio atmosférico pela sua reação química com o N_2O . As sugestões que podem ser feitas atualmente para se restringirem as perdas gasosas de N são: manter a cultura no solo por maior tempo possível, prover boas condições de drenagem e subsolagem, e evitar sempre que possível o excesso de compostos nitrogenados minerais no solo.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2.ed. New York, John Wiley, 1977, 465p.
- BLACK, C.A. Soil-plant relationships. 2.ed. New York, John Wiley, 1967. 792p.
- BREMNER, J.M. & BUNDY, L.G. Inhibition of nitrification in soils by volatile sulfur compounds. Soil Biol. Biochem., Oxford, 6:161-165, 1974.
- BROADBENT, F.E. Turnover of nitrogen in soil organic matter. In: ORGANIC MATTER AND SOIL FERTILITY, Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia, 32. Davies. 1968. New York, North Holland/Wiley, 1968. p.61-83.
- BROADBENT, F.W. & TYLER, K.B. Nitrification of ammoniacal fertilizers in some californian soils. Hilgardia, Berkeley, 27:247-267, 1957.
- BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. Biology of microorganisms 6. ed. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall, 1991. 643p.
- BUCKMAN, H.O. & BRADY, N.C. Natureza e propriedade dos solos. 4.ed. Rio de Janeiro. 1976. 594p.
- BUNDY, L.G. & BREMNER, J.M. Effects of nitrification inhibitors on transformations of urea nitrogen in soils. Soil Biol. Biochem., Oxford, 6:369-376, 1974.

9. CORNFORTH, I.S. & CHESNEY, H.A.D. Nitrification inhibitors and ammonia volatilization. *Pl. Soil, Hague*, 34:497-501, 1971.
10. DELWICHE, C.C. The nitrogen cycle. *Sci. Amer., New York*, 23:137-146, 1970.
11. FIRESTONE, M.K. Biological denitrification. In: *Nitrogen in agricultural soils*. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1982. p.289-326.
12. FOCHT, D.D. & VERSTRAETE, W. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microbiol. Ecol.*, 1:135-214, 1977.
13. FRENEY, J.R., SIMPSON, J.R. & DENMEAD, O.T. Volatilization of ammonia. In: FRENEY, J.R. & SIMPSON, J.R. eds. *Gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems*. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, 1983. p.1-32.
14. HUBER, D.M.; WARREN, H.L.; NELSON, D.W.; TSAI, C.Y.; ROSS, M.A. & MENGEL, D. Evaluation of nitrification inhibitors for no-till corn. *Soil Sci., Baltimore*, 134:388-394, 1982.
15. HUBER, D.M.; WARREN, H.L.; NELSON, D.W.; TSAI, C.Y. & SHANER, G.W. Response of winter wheat to inhibiting nitrification of fall-applied nitrogen. *Agron. J., New York*, 72:632-637, 1980.
16. MAGALHÃES, A.M.T.; CHALK, P.M. & STRONG, W.M. Effect of nitrapyrin on nitrous oxide emission from fallow soils fertilized with anhydrous ammonia. *Fertilizer Res., Hague*, 5:411-421, 1984.
17. MAGALHÃES, A.M.T. & CHALK, P.M. Nitrogen transformation during hydrolysis and nitrification of urea. II. Effect of fertilizer concentration and nitrification inhibitors. *Fertilizer Res., Hague*, 11(2):173-184, 1987.
18. MAGALHÃES, A.M.T. Nitrogen transformations in soils during nitrification of alkaline-hydrolysing fertilizers. *Austrália, The Univ. of Melbourne*, 1985, 130p. (Tese de Doutorado).
19. NOMMIK, H. & NILSSON, K.O. Nitrification and Movement of Anhydrous Ammonia in Soil. *Acta Agric. Scand., Estocolmo*, 13:205-219, 1963.
20. POWLSON, D.S. & JENKINSON, D.S. Inhibition of nitrification in soil by carbon disulphide from rubber bunds. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 3:267-269, 1971.
21. RIDGE, E.H. Studies on soil fumigation - II. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 8:249-253, 1976.
22. RODGERS, G.A. Effect of dicyandiamide on ammonia volatilization from urea in soil. *Fertilizer Res., Hague*, 4:361-367, 1983.
23. ROVIRA, A.D. Studies on soil fumigation - I. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 8:241-247, 1976.
24. SCHMIDT, E.L. Nitrification in soil. In: STEVENSON, F.J. ed. *Nitrogen in agricultural soils*. Madison, ASA/CSSA/SSSA, 1982. p.243-288. (Agronomy, 22)

25. STEVENSON, F.J. Soil nitrogen. In: VINCENT SAUCHELLI, ed. *Fertilizer nitrogen: its chemistry and technology*. New York, Reinhold/Chapman Hall, 1964. p.18-39.
26. STEVENSON, F.J. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F.J. ed. *Nitrogen in agricultural soils*. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy, 1982. p.1-42 (Agron. Monogr, 22)
27. WARREN, H.L.; HUBER, D.M.; NELSON, D.W. & MANN, D.W. Stalk rot incidence and yield of corn as affected by inhibiting nitrification of fall-applied ammonium. *Agron. J., Madison*, 67:655-660, 1975.

FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO PELA SIMBIOSE RIZÓBIO/LEGUMINOSAS

João R. J. Freire⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

As leguminosas já eram cultivadas para alimento pelo homem antigo desde o fim da idade da pedra e do bronze. Segundo o clássico livro de Fred, Baldwin e McCoy (21); referências escritas nos chegaram de Theophrastus, 370-285 a.C., sobre o valor das leguminosas como revigorantes do solo, quando a ele incorporadas. Primeiramente foram observados "corpúsculos como bactérias" dentro dos nódulos (60). Mais tarde, Boussingault (8) provou que a ervilha era capaz de obter N do ar o que não ocorria com o trigo. Porém, a comprovação definitiva da função dos nódulos veio com os trabalhos de Hellriegel em 1886 (32) e Hellriegel e Wilfarth em 1888 (33). Nesse ano também, Beijerinck isolou e cultivou pela primeira vez a bactéria a que deu o nome de *Bacillus radicola* (5).

A aplicação prática dos conhecimentos veio lentamente. Os antigos inoculantes consistiam de terra de cultivo antigo e de macerado dos nódulos revolvido com as sementes. A primeira fábrica de culturas puras de rizóbio foi estabelecida na Alemanha no início do século e, logo a seguir, nos Estados Unidos.

Segundo Lopes (38), o pioneirismo em pesquisas com rizóbio/leguminosas no Brasil cabe ao Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo. Em 1930 já havia distribuição de culturas puras de *Rhizobium* para inoculação de sementes.

A primeira fábrica particular no país foi estabelecida em 1956 na cidade de Pelotas, com a assistência técnica do grupo da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, que iniciou em 1950 a produção de inoculantes (23).

⁽¹⁾ Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 776, CEP 90.000, Porto Alegre, RS. Bolsista do CNPq.

AS LEGUMINOSAS

A família Leguminosae conta com 16000 a 19000 espécies, em cerca de 750 gêneros, das quais apenas cerca de 200 são cultivadas pelo homem e 20 de maior importância econômica. A família é dividida em três sub-famílias (2):

a) **Mimosoideae** - árvores, arbustos, trepadeiras lenhosas, poucas plantas herbáceas e são, na maioria, tropicais;

b) **Cesalpinoideae** - árvores, arbustos, raramente plantas herbáceas, tropicais e sub-tropicais;

c) **Papilionoideae** - árvores, arbustos, plantas herbáceas, anuais ou perenes, com as principais espécies de interesse econômico como: *Phaseolus*, *Glycine*, *Trifolium*, *Medicago*, *Vicia*, *Pisum*, entre outras.

Apesar das leguminosas estarem em segundo plano em relação à área cultivada e como produtoras de alimento no mundo, elas têm papel fundamental no equilíbrio do nitrogênio nos ecossistemas naturais. A associação rizóbio/leguminosas é responsável pela fixação de pelo menos 35 milhões de toneladas de nitrogênio anualmente (42). Em relação à produção de alimentos no mundo, as leguminosas constituem cerca de 9% em matéria seca, porém representam 24% do total de proteína (31), além de fornecerem matérias-primas (Quadro 1).

Quadro 1. Uso e potencial de leguminosas⁽¹⁾

| Uso | Espécies |
|---------------------------------------|---|
| Grãos | <i>Glycine max</i> (soja), <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijoeiro), <i>Arachis hypogea</i> (amendoim), <i>Pisum sativum</i> (ervilha), <i>Vicia faba</i> (fava), <i>Lens esculenta</i> (lentilha), <i>Cicer arietinum</i> (grão-de-bico), <i>Vigna</i> (feijão miúdo, feijão de corda), <i>Phaseolus lunatus</i> (feijão lima), <i>Lupinus</i> spp. (tremoço), <i>Cajanus cajan</i> (guandu). |
| Tubérculos | <i>Pachyrhizus</i> , <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (feijão alado), <i>Pueraria</i> . |
| Forrageiras | Tropicais: <i>Desmodium</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Centrosema</i> , <i>Arachis pintoii</i> , <i>Cajanus cajan</i> . Temperadas: <i>Trifolium</i> , <i>Medicago</i> , <i>Lotus</i> . |
| Frutas | <i>Prosopis</i> , <i>Inga</i> , <i>Tamarindus</i> . |
| Adubo verde e recuperação de solos | <i>Vigna</i> , <i>Cajanus</i> , <i>Crotalaria</i> , <i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Albizia</i> , <i>Calopogonium</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Mucuna</i> , <i>Canavalia</i> . |
| Madeira, combustível, gomas, resinas. | <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Parkia</i> . |

⁽¹⁾ Adaptado de National Academy of Science (43).

O MICROSSIMBIONTE

As bactérias produtoras de nódulos em leguminosas pertencem à família Rhizobiaceae, dela fazendo parte os gêneros *Rhizobium* (espécies de crescimento rápido) e *Bradyrhizobium* (espécies de crescimento lento) (34).

A primeira classificação das bactérias se baseava nos conceitos de grupos de inoculação cruzada (21). Os estudos mais abrangentes demonstraram a alta ocorrência de inoculações cruzadas entre grupos distintos, inviabilizando a manutenção desta classificação. Pela classificação atual, baseada em evidências de taxonomia numérica, homologia do DNA, eletroforese das proteínas celulares, sorologia, composição da goma extracelular e transferência de infectividade via plasmídios, algumas espécies foram fundidas e o gênero desmembrado, permanecendo porém, pouco estudado um imenso número de rizóbios tropicais selvagens (34).

Recentemente foi isolado, a partir de nódulos de soja provenientes da China, um rizóbio de crescimento rápido e produtor de ácido, para o qual foi proposto o nome de *Rhizobium fredii* (35). Determinou-se, então, que esse rizóbio nodulava efetivamente *Glycine max* cv. Peking e *Glycine soja* e inefetivamente cultivares americanas de soja. Esse rizóbio nodula efetivamente também o caupi (*Vigna unguiculata*) e o feijão guandu (*Cajanus cajan*) (55).

A NODULAÇÃO

O processo de formação de nódulos pode ser resumidamente dividido nas seguintes fases, representadas na figura 1 (53,15):

Quadro 2. Características de nodulação das espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*⁽¹⁾

| Espécies ⁽²⁾ | Hospedeiros |
|--------------------------------|---|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | |
| bv <i>viciae</i> | <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lens</i> , <i>Lathyrus</i> |
| bv <i>trifolii</i> | <i>Trifolium</i> |
| bv <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>R. meliloti</i> | <i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> |
| <i>R. loti</i> | <i>Lotus</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Anthyllis</i> , <i>Cicer</i> , <i>Ornithopus</i> , <i>Caragna</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Mimosa</i> |
| <i>Bradyrhizobium</i> | |
| <i>B. japonicum</i> | <i>Glycine max</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> |
| <i>B. sp</i> | <i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Ornithopus</i> , <i>Arachis</i> , <i>Cicer</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Desmodium</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Lablab</i> , <i>Acacia</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Glycine</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Lotus</i> , <i>Phaseolus</i> . |

⁽¹⁾ Adaptado de Jordan (34). ⁽²⁾ Existe uma maior ou menor possibilidade de reações cruzadas, entre tipos de uma espécie e plantas de outras espécies, dependendo do grupo.

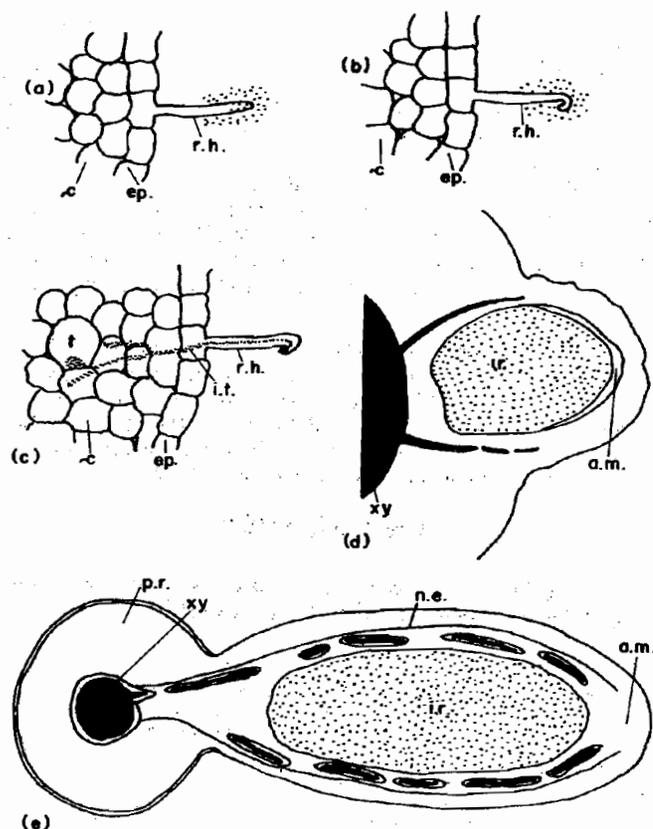


Figura 1. Formação e estrutura dos nódulos:

a) Reconhecimento e adesão das células do rizóbio a pêlo radicular. b) Enrugamento do pêlo radicular formando o "bastão de pastor". c) Infecção e penetração ao longo do pêlo, córtex interno até penetração em célula tetraplóide e estímulo da atividade meristemática. d) Zona central infectada e meristema apical ou periférico tornam-se distintos. e) Corte longitudinal do nódulo, (a.m. - meristema apical; c - córtex; ep - epiderme; i.r. - região infectada; i.t. - cordão infeccioso; n.e. - endodermis do nódulo; p.r. - raiz primária; r.h. - pêlo radicular; t - célula tetraplóide; xy - xilema). Reimpressão da figura 2, Stewart (53), com permissão da The Athlone Press, Londres.

a) **Quimotaxia do Rizóbio em Direção à Superfície das Raízes** - A atração química tem sido demonstrada em alguns casos, porém parece não ser essencial. Também já foi assinalada atração de crescimento radicular em direção a colônias imobilizadas de rizóbio;

b) **Proliferação do Rizóbio na Rizosfera** - Os exsudatos radiculares estimulam a população de rizóbio na rizosfera; entretanto o estímulo não é específico, pois pode ocorrer multiplicação na rizosfera de leguminosas não compatíveis;

c) **Aderência do Rizóbio às Raízes** - Diversos mecanismos conduzem à aderência das células bacterianas aos pêlos radiculares, podendo ser específicos ou não. Com *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, foi demonstrado que a proteína trifoliol produzida pelo trevo pode estar envolvida no processo de reconhecimento e aderência. Estas proteínas, denominadas lectinas, também foram observadas em outras espécies (*Vicia* e *Glycine*). A proteína aglutina com a bactéria e forma os sítios receptores. Outros mecanismos têm sido propostos, como por exemplo aquele segundo o qual, muitas espécies de rizóbio produzem microfibrilas celulósicas que servem para ancorar a bactéria à superfície radicular, permitindo reações bioquímicas que desencadeiam encurvamento do pêlo radicular e a penetração;

d) **Encurvamento do Pêlo Radicular** - Após o reconhecimento e aderência, a bactéria causa o encurvamento do pêlo radicular por processo bioquímico ainda indeterminado. Somente rizóbio homólogo consegue infectar a leguminosa susceptível, a partir de células englobadas pelo encurvamento do pêlo;

e) **Formação do Cordão de Infecção** - A bactéria penetra o pêlo radicular por invaginação da parede que pode ser devida à dissolução enzimática, abrاندando a resistência da parede celular, ou devido à penetração entre espaços das microfibrilas celulósicas do pêlo radicular. O mecanismo da infecção em algumas leguminosas tropicais (*Arachis* e *Aeschynomene*) e principalmente nas espécies arbóreas é diferente do acima descrito, comum nas leguminosas de clima temperado (ver capítulo 11).

f) **Formação do Nódulo** - A formação do nódulo teria origem a partir da mitose acelerada de células hipodérmicas pré-existentes, determinada por fatores estimulantes provenientes da bactéria. Esse estímulo é dirigido a células localizadas nas proximidades dos polos do xilema da planta. O ponto inicial da divisão hipodérmica forma o meristema primário do nódulo. Quando a bactéria ataca e invade o pêlo radicular, o meristema primário do nódulo induz a divisão pericíclica, próxima da região do xilema, formando o meristema secundário do nódulo, que se funde ao primário através da ramificação do cordão de infecção. Tanto as células da planta em divisão quanto as invadidas se fundem, e as células contendo as bactérias aumentam rapidamente, agigantam-se e ficam restritas a uma zona central ou apical do nódulo, o qual cresce e se diferencia. A bactéria se

diferencia em bacteróide (morfológica, bioquímica e fisiologicamente diferente da bactéria livre). As células bacterianas permanecem envolvidas, isoladamente ou em grupos, por uma membrana chamada envelope membranoso.

Além dos nódulos de leguminosas em que ocorre a fixação do N_2 , conhecem-se também os nódulos de outras plantas, nos quais a fixação do N_2 é devida a um actinomiceto. A estrutura desses nódulos, porém, é diferente dos aqui descritos (7) (Capítulo 11).

Antes de se iniciar o processo da fixação, ocorre a produção de um pigmento, a leg-hemoglobina, que tem a função importante no transporte de oxigênio para a respiração dos bacteróides. Esta proteína mantém o oxigênio na forma associada, não permitindo a presença de oxigênio livre, que afetaria o funcionamento da nitrogenase.

Ao contrário das outras hiperplasias provocadas nos vegetais por insetos, nematóides ou *Agrobacterium tumefaciens*, os nódulos têm estrutura perfeitamente organizada:

a) camada de células corticais mais ou menos espessa, que envolve todo o nódulo;

b) área meristemática, de crescimento apical, ou circundando quase todo o nódulo; e

c) área fixadora, central ou apical, constituída de células de tamanho várias vezes maior que o normal, contendo os bacteróides. Cada célula vegetal pode conter milhares de bacteróides e o nódulo, 1 milhão a 1 bilhão. Há uma elevada variação quanto à morfologia, número e posição dos nódulos. A forma do nódulo depende da planta, podendo ser esférica, cilíndrica, multilobada ou coraloide. O tamanho também é relacionado à espécie da planta e à efetividade da simbiose. A posição na raiz principal e/ou junto ao colo da planta, indica uma formação precoce e efetiva, ao contrário de formação nas raízes secundárias que indica uma infecção tardia e/ou estirpes pouco competitivas ou pouco efetivas. O crescimento do nódulo ocorre até atingir o tamanho máximo, em função da espécie. Em solos com poucas células do rizóbio, os poucos nódulos formados tendem a crescer ao máximo, pela exigência da planta em nitrogênio. Ao atingir o florescimento ou o final do ciclo da planta, os nódulos senescem e o pigmento da hemoglobina (vermelha) muda de cor para verde ou castanho. Em condições de estresse ambiental, por exemplo, os nódulos podem senescer precocemente. Em algumas espécies arbóreas ocorrem nódulos indeterminados ou perenes, cujo crescimento é contínuo e anual. Em geral, esses nódulos são coraloídes. Em plantas anuais, a persistência dos nódulos é variável, podendo durar todo o ciclo ou diversas camadas de nódulos se sucederem.

O julgamento da eficiência da nodulação é de importância, seja para o técnico ou o agricultor nas lavouras, seja em trabalhos experimentais, pois dá indicação preciosa sobre o suprimento em nitrogênio que as plantas estão obtendo (Quadro 3).

Quadro 3. Classificação e descrição de resposta de nodulação em leguminosas

| Classificação | Descrição | Diagnóstico |
|--------------------------|---|--|
| I. Plantas não noduladas | Sem nódulos. Plantas pouco desenvolvidas e cloróticas | Estirpe do rizóbio nativo ou inoculado não compatível. Inoculante de má qualidade. Condições adversas, como toxidez de Al e Mn ou alta temperatura e baixa umidade do solo |
| II. Plantas noduladas | | |
| A. Nódulos inefetivos | Raízes com pequenas estruturas nodulares de cor interna branca, verde ou ligeiramente rosada, principalmente nas raízes secundárias. Zona fixadora com grande proporção de células não invadidas. Plantas pouco desenvolvidas e cloróticas. | Estirpe do rizóbio infectiva, porém, simbiose não efetiva. Simbiose inibida por deficiência de macro e/ou micronutrientes ou toxidez de Al e Mn, ou por fatores físicos. |
| B. Nódulos efetivos | Raízes com nódulos relativamente grandes principalmente na raiz principal e próxima ao colo da planta, de cor intensa rosa-vermelha. Zona fixadora com pequena proporção de células não invadidas. Plantas bem desenvolvidas e folhas verde-escuro. | Estirpe infectiva e simbiose efetiva. Suficiente suprimento de nitrogênio à planta complementando o nitrogênio mineral do solo. |

A falta de avaliação da nodulação pode conduzir o experimentador a erros graves na interpretação dos resultados. Em experimentos de competição de espécies ou variedades, se não há uma fixação de N_2 e nodulação o mais possível uniforme para todas (devido, por exemplo, à falta de afinidade de uma delas pela estirpe do rizóbio do inoculante ou existente no solo), umas poderão estar beneficiadas pelo adequado suprimento de nitrogênio, e outras, com nodulação ineficiente, estarão prejudicadas. Daí que, com a observação da nodulação, o comportamento dos materiais será melhor julgado. Também em experimentos de adubação e calagem, por exemplo, se não é feita uma boa inoculação de sementes ou não há no solo uma população nativa de rizóbios eficientes para a leguminosa reagente, ou ainda, se algum outro fator inibe a formação e/ou o funcionamento dos nódulos, a resposta das plantas aos tratamentos pesquisados será evidentemente prejudicada pela deficiência de nitrogênio. Exemplificando: a deficiência de fósforo afeta a formação e o funcionamento dos nódulos e, por outro lado, a nodulação deficiente inibe a resposta das plantas à adubação fosfática, pois, se o solo não é rico no elemento, faltará nitrogênio para o crescimento e produção.

ECOLOGIA

O rizóbio pode viver saprofiticamente sem fixar N_2 no solo, sendo uma bactéria típica de rizosfera. Nestas condições, utiliza as fontes de energia, N e nutrientes da solução do solo.

Diversos autores têm revisado os conhecimentos existentes sobre a ecologia do rizóbio (1,12,56,58). Alexander (1) chama a atenção para o fato de que os investigadores devem ter presente que a susceptibilidade de rizóbio à influência ambiental é variável com as espécies e mesmo estirpes. Alguns são naturalmente numerosos no solo, enquanto que outros são raros, ou mesmo inexistentes, se evoluíram em associação com leguminosas exóticas como a soja.

As estirpes variam quanto à rapidez relativa em dominar os sítios de nodulação, quando em presença de outras estirpes. Seja em ambiente estéril, seja no solo, a proporção de nódulos formados por uma das estirpes em uma mistura depende também da proporção relativa de cada uma no inóculo. Essa propriedade é denominada competitividade. Entretanto, o termo competitividade é inadequado, pois o que se avalia é a proporção de estirpes formadoras de nódulos e não a real população daquela estirpe junto às raízes.

Estirpes de alta competitividade, introduzidas em uma área juntamente com outras, podem ir perdendo essa competitividade, ao passo que outras,

Quadro 4. Recuperação por identificação de nódulos por aglutinação sorológica de quatro estirpes inoculadas, em parcelas distintas, em 1973 na variedade de soja Bragg. Guaíba, RS*

| Estirpes recuperadas | 1974 | | | | | | 75 | | | | | | 76 | | | | | | 78 | | | | | | 79 | | | | | | 83 | | | | | |
|----------------------|-----------|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|-----------|-----|----|----|----|----|-------------|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|--|
| | Inoc. 527 | | | | | | Inoc. 566 | | | | | | Inoc. 586 | | | | | | Inoc. 587 | | | | | | Testesmunha | | | | | | | | | | | |
| 527 | 95 | 90 | 20 | 1 | 0 | 8 | 5 | 0 | 9 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | | | | | | | |
| 566 | 0 | 0 | 17 | 4 | 8 | 32 | 2 | 0 | 16 | 23 | 10 | 22 | 0 | 0 | 9 | 4 | 2 | 24 | 2 | 0 | 6 | 8 | 10 | 34 | 5 | 0 | 17 | 6 | 8 | 14 | | | | | | |
| 586 | 0 | 0 | 15 | 3 | 0 | 14 | 10 | 7 | 12 | 3 | 42 | 2 | 95 | 74 | 66 | 88 | 2 | 8 | 0 | 0 | 15 | 4 | 5 | 2 | 5 | 30 | 22 | 3 | 2 | 4 | | | | | | |
| 587 | 5 | 10 | 35 | 24 | 40 | 20 | 82 | 90 | 55 | 29 | 20 | 34 | 5 | 16 | 20 | 21 | 35 | 16 | 95 | 100 | 68 | 21 | 40 | 12 | 32 | 50 | 47 | 13 | 52 | 28 | | | | | | |
| S/RE** | 0 | 0 | 2 | 57 | 45 | 24 | 1 | 1 | 6 | 33 | 27 | 22 | 0 | 6 | 0 | 62 | 50 | 40 | 3 | 0 | 2 | 48 | 23 | 30 | 5 | 5 | 2 | 62 | 34 | 40 | | | | | | |

* Média de 8 subparcelas (80 nódulos). **Sem reação. Fonte: Freire et al. (24), completada com dados de 1983.

com baixa ocupação inicial, se adaptam e ressurgem em alta porcentagem nos nódulos, como foi o caso da estirpe SEMIA-566, que inicialmente não conseguia nodular, mas que, 10 anos após a sua introdução, passou a ser dominante na formação dos nódulos (Quadro 4).

Na rizosfera, o rizóbio interage com os demais microrganismos, além de competir com outras estirpes pelos sítios de infecção. A sobrevivência do rizóbio no solo é afetada por fatores edafoclimáticos e biológicos, discutidos nos Capítulos 15, 16 e 4.

ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA

O mecanismo de reconhecimento entre a bactéria e a planta, a infecção e a formação dos nódulos obedece a complexo conjunto de informações genéticas, derivadas da evolução conjunta da planta e da bactéria (Capítulo 4). Essa evolução deu origem à especificidade entre dois parceiros, a qual deve ser considerada sempre que se objetivar introduzir leguminosas em uma região e/ou selecionar estirpes. A especificidade é maior entre as leguminosas de clima temperado do que entre as tropicais e pode ocorrer a nível de espécie ou mesmo de cultivares. Mesmo dentre as tropicais há ocorrência de grupos com alta especificidade.

Quadro 5. Eficiência de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em três espécies de *Trifolium*, em areia e solução nutritiva. Secr. Agr. RGS

| Espécies | Estirpes | | | | |
|-----------------------|----------|-----|------|-----|-----|
| | 200a | 204 | 208c | 235 | 265 |
| <i>T. fragiferum</i> | - | E | E | E | E |
| <i>T. repens</i> | - | - | E | - | E |
| <i>T. vesiculosum</i> | - | - | E | - | - |

E: eficiente. - : ineficiente.

SELEÇÃO E MELHORAMENTO

MICROSSIMBIONTE

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com o objetivo de aplicação prática na inoculação de leguminosas têm sido objeto de muitos trabalhos (6,9,10,14,18,30,36,37,45,52,54,57). A seleção deve

objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes no local de emprego e competitivas frente à população nativa. Vários aspectos agrônômicos e culturais devem ser observados (Quadro 6).

Quadro 6. Rendimento de grãos como efeito da inoculação de quatro estirpes de *R. japonicum* em três variedades de soja. SMA/Sec. Agr., RS

| Tratamento estirpe | Variedade | | |
|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| | Hood | Majos | Hill |
| | kg/ha | | |
| Testemunha | 1.756 | 1.467 | 1.467 |
| 519 Re | 1.976(25) ⁽¹⁾ | 1.572(21) | 1.615(10) |
| 506 | 1.967(25) | 1.995(36) | 1.867(27) |
| 509 | 1.842(17) | 2.005(37) | 1.733(18) |
| 532c | 2.180(38) | 2.115(44) | 1.907(30) |

(1) Números entre parênteses representam a porcentagem do incremento de produção de grãos em relação as testemunhas não-inoculadas.

É alta a diversidade genética dentro da população de rizóbio no ambiente natural, devido à rápida reprodução, variações e mutações, e também devido aos processos naturais de transferência genética.

A rapidez da multiplicação bacteriana faz com que a chance de aparecimento de mutantes seja extremamente alta, especialmente com os rizóbios de crescimento rápido. O aparecimento de mutantes inefetivos ou mesmo não nodulantes constitui um sério perigo para as culturas em coleção e, conseqüentemente, para a produção de inoculantes, tendo sido já observada em várias espécies de rizóbio, e assumindo proporções mais alarmantes com as estirpes de rizóbio de feijão (46). Daí a importância da manutenção das culturas sob a forma liofilizada, ou em nitrogênio líquido.

Nos testes de competitividade entre as estirpes, torna-se necessária a prévia caracterização sorológica das mesmas, o que possibilitará sua identificação ou a utilização de mutantes tolerantes a antibióticos, no caso de combinações de estirpes do mesmo grupo sorológico. Visando a um maior desempenho das estirpes nas condições de campo, outras propriedades são pesquisadas, em dependência dos objetivos visados e da própria capacitação da pesquisa (56).

O estudo da capacidade de sobrevivência ou persistência no solo é de primordial importância, especialmente para forrageiras perenes, ou anuais de ressemeadura natural, mas também para leguminosas anuais. É de importância ressaltar que estes estudos devem ser feitos em diversos estádios do crescimento

da planta e a médio-longo prazo, por vários cultivos, pois essas características podem se alterar, com a variação ou mutação genética das estirpes oriundas de regiões ecologicamente distintas.

A técnica do DNA recombinante está sendo tentada para melhorar certas propriedades de estirpes de rizóbio. Também a transferência de características desejáveis, através dos plasmídios, é considerada altamente promissora. A tecnologia dos plasmídios ainda pode ser usada para a introdução, no rizóbio, da propriedade de produção de antibióticos, aumentando sua capacidade competitiva na rizosfera. Por outro lado, alguns pesquisadores crêem que deveriam ser obtidas estirpes sem persistência no solo, para que não ocorram problemas no caso de introdução de novas estirpes ou variedades da leguminosa não compatíveis com a estirpe estabelecida. Assim, estão se buscando estirpes mais eficientes e com o plasmídio "suicida", isto é, que após um curto período deixam de ser infectivas.

MACROSSIMBIONTE

A função da planta na simbiose com rizóbio e a fisiologia do processo foram objetos de inúmeras revisões (13, 17, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 39, 44). A planta hospedeira é um parceiro ativo da fixação, havendo nela enorme potencial de melhoramento de capacidade simbiótica e aumento do potencial de fixação. Existe variabilidade genética natural e que pode ser induzida no macrossimbionte, porém, no passado, houve pouca preocupação dos melhoristas para essa possibilidade.

Freqüentemente, os programas de melhoramento agrônômico das culturas não levam em conta a capacidade das leguminosas fixarem N₂. Devido a isto, o melhoramento é, com freqüência, feito em áreas experimentais de alta fertilidade ou adubadas com nitrogênio, e os parâmetros observados não incluem avaliações sobre o sistema radicular e nodulação, como aconteceu com o feijão. A soja representa uma exceção, pois desde a sua introdução, os programas de melhoramento sempre se preocuparam com a nodulação.

A avaliação do germoplasma deve incluir as variedades existentes e material selvagem, que possivelmente pode incluir mais alto potencial, porque evoluíram em solos pobres, especialmente provenientes dos locais de origem da leguminosa. O potencial deve ser avaliado em condições de alto e baixo teor de nitrogênio mineral, a fim de se identificar material de alto rendimento nas duas condições. As melhores estirpes disponíveis do rizóbio devem ser usadas e a comparação com o tratamento em alto nitrogênio dirá da necessidade de obtenção de melhores estirpes que atendam à exigência da planta. As observações devem incluir, além das características agrônômicas, os aspectos relativos à nodulação.

A quantidade de nitrogênio fixada pela associação é o resultado da taxa de fixação e da duração do processo. O melhoramento do feijoeiro, visando a materiais de ciclo exageradamente curto e sem a busca de resposta à simbiose, resultou em cultivares de sistema radicular precário, altamente sensíveis à pequena variação de umidade, de nodulação tardia e/ou precoce senescência dos nódulos e curto período de fixação. Felizmente, no Brasil, hoje em dia, há um ativo programa envolvendo diversas instituições em busca da melhor resposta do feijoeiro à simbiose com *Rhizobium* (16, 48, 50).

BENEFÍCIOS DA FIXAÇÃO

A fixação do N_2 pela associação rizóbio/leguminosas varia com a bactéria, a planta e as condições ambientes. Leguminosas forrageiras usualmente fixam mais nitrogênio do que as produtoras de grão, devido à maior demanda de carboidratos nestas últimas (Quadro 7). Nas forrageiras, a fixação total depende também da duração do ciclo da planta e do número de cortes.

Quadro 7. Nitrogênio fixado por várias associações rizóbio/leguminosas (10, 42, 51)

| Leguminosa | Amplitude aproximada do N_2 fixado kg/ha/ano |
|--|---|
| Alfafa, <i>Medicago sativa</i> | 100-300 |
| Trevo doce, <i>Medicago sativa</i> | 125 |
| Trevo, <i>Trifolium sp</i> | 100-150 |
| Caupi, <i>Vigna unguiculata</i> | 85 |
| Fava, <i>Vicia faba</i> | 240-325 |
| Lentilha, <i>Lens sp</i> | 100 |
| Lupinus, <i>Lupinus sp</i> | 150-200 |
| Amendoim, <i>Arachis hypogaea</i> | 50 |
| Soja, <i>Glycine max</i> | 60-80 |
| Feijão mung, <i>Vigna radiata</i> | 55 |
| Feijão velvet, <i>Mucuna pruriens</i> | 155 |
| Leguminosas forrageiras, <i>Desmodium sp.</i> , <i>Lespedez sp</i> | 100-140 |

Dentre os fatores do solo que condicionam a resposta da simbiose, resultando na nodulação e na fixação do N_2 (Quadro 3), podemos relacionar as características das populações de rizóbio específico existentes no solo e o teor de nitrogênio mineral do mesmo. Evidentemente, a resposta em termos de nitrogênio fixado é máxima em solo de baixo nitrogênio mineral, e os efeitos da inoculação são maiores quando o rizóbio nativo é inespecífico ou está em baixo número.

Sob o ponto de vista econômico, a fixação de N_2 proporciona considerável economia no plantio das leguminosas. A soja, por exemplo, pode produzir em média 2450 kg/ha, ou seja, rendimento praticamente igual ao do tratamento com 250 kg/ha de fertilizante nitrogenado, onde a inoculação proporcionou aumentos de 41% na produção (Quadro 8). A necessidade de nitrogênio mineral para esta produção (2450 kg/ha) pode ser estimada em cerca de 229 kg N/ha.

Sendo os nossos solos em geral pobres em matéria orgânica, não haveria adequado suprimento de N às plantas, sem o uso de fertilizante nitroge-

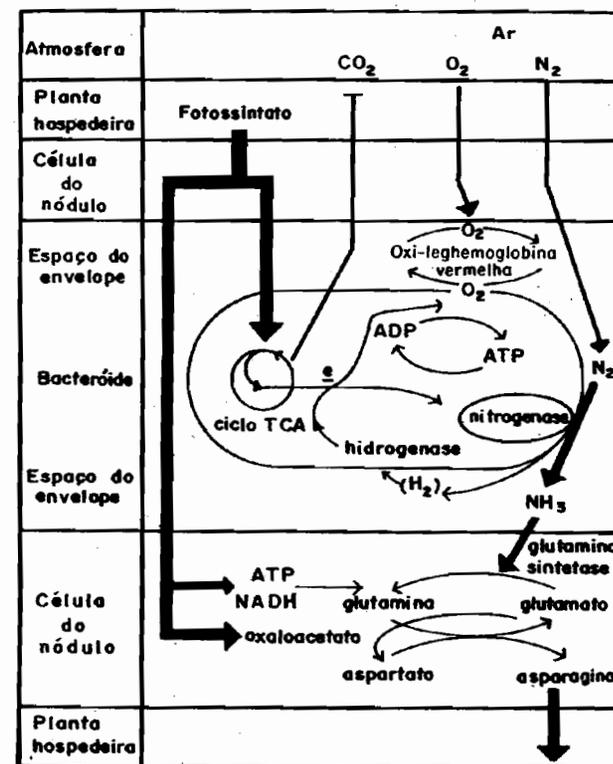


Figura 2. Principais caminhos metabólicos associados com a fixação do N_2 nos nódulos das leguminosas, especialmente referentes aos conhecimentos existentes para soja e tremoço. Segundo Bergersen.

nado. Assim sendo, o rendimento previsto não seria alcançado e o agricultor estaria perdendo o investimento nos outros insumos (41).

Esse cálculo é, em geral, pouco comum entre os agricultores e mesmo técnicos. O baixo custo no Brasil do inoculante, mais a mão-de-obra de aplicação, fazem compensar largamente a aplicação do inoculante de forma maciça e não esperar que a inoculação natural do solo já plantado anteriormente seja suficiente.

Quadro 8. Rendimento de grãos de soja, nitrogênio total na semente e nitrogênio fixado em vários níveis de nitrogênio aplicado (Média de 4 anos)

| Linhagens de soja | N aplicado | Rendimento | kg/ha | | % |
|-------------------|------------|------------|----------------|----------|----|
| | | | N nas sementes | N fixado | |
| Nodulífera | 0 | 2.706 | 178 | 71 | 40 |
| Não-nodulífera | 0 | 1.848 | 106 | | |
| Nodulífera | 56 | 2.686 | 178 | 57 | 32 |
| Não-nodulífera | 56 | 2.125 | 120 | | |
| Nodulífera | 112 | 2.772 | 183 | 44 | 24 |
| Não-nodulífera | 112 | 2.343 | 138 | | |
| Nodulífera | 168 | 2.765 | 185 | 24 | 13 |
| Não-nodulífera | 168 | 2.574 | 161 | | |

Tornou-se comum no Brasil, no início da expansão da soja, a recomendação de "nitrogênio de partida" (10-20 kg/ha), hoje abolida, pois pesquisas desenvolvidas evidenciaram que, estando a soja bem nodulada, não há resposta, em termos de produção de grãos, à aplicação dessa pequena quantidade nem a altas doses de nitrogênio (3,4,11) e que a prática conduzia a um desperdício de 87.000 toneladas/ano nas fórmulas recomendadas para soja.

A contribuição da fixação de N₂ na cultura da soja pode ser calculada e dá uma amostra do quanto o processo representa, em termos econômicos para o Brasil.

O valor das leguminosas em pastagens consorciadas ou isoladamente (banco de proteína) readquire interesse no país, seja no Sul - com as leguminosas de clima temperado como trevos, alfafa, cornichão, ervilhaca - ou no Centro, - com as tropicais, como soja perene, centrosema, estilosantes, desmódio e leucena. O benefício da consorciação de leguminosas com gramíneas em pastagens baseia-se na transferência do nitrogênio fixado pela leguminosa para a gramínea associada.

As espécies de leguminosas variam grandemente na habilidade de transferir o N₂ fixado para a gramínea consorciada (40, 49, 59)

Nos últimos anos tem ganho alto interesse o estudo de culturas intercalares perenes de leguminosas arbóreas ou arbustos, que serão discutidas no capítulo 11.

PRODUÇÃO DE INOCULANTES

Os princípios básicos da produção e controle de qualidade de inoculantes para leguminosas têm sido bem definidos (22, 47).

De nada vale o investimento em seleção de estirpes e em obtenção de conhecimentos em fatores limitantes, por exemplo, se as estirpes não são usadas em inoculantes e/ou estes não apresentam boa qualidade. Isso vale principalmente para locais em que é baixa ou nula a população do rizóbio específico.

Os inoculantes devem ser fabricados com estirpes recomendadas pelos laboratórios de pesquisa governamentais (de acordo com a legislação em vigor). O padrão mínimo é de 10 milhões de células de rizóbio por grama do veículo (20). A Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros Microrganismos Fixadores de Nitrogênio (RELARE) indica as estirpes a serem usadas, que são armazenadas no Laboratório do Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio, do Instituto Agrônomo do Rio Grande do Sul, que as distribui anualmente para os fabricantes.

O controle de qualidade (22) dos inoculantes é exercido pelo Ministério da Agricultura, que coleta as amostras nas fábricas e os remete ao IPAGRO para análise.

Entretanto, o controle é precário pois não inclui amostragens de inoculantes após a distribuição. Maiores detalhes sobre produção e uso de inoculantes de rizóbio podem ser encontrados no Manual da FAO (20).

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Ecology of *Rhizobium*. In: Alexander M. ed. Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. Plenum Press, New York, 1984. p. 39-50.
- ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. The leguminosae. Univ. of Wisconsin Press, 1981. 812p.
- BARNI, N.A.; KOLLING, J. & MINOR, H.C. Efeito de níveis de nitrogênio sobre o rendimento de grãos, nodulação e características agrônomicas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) Agron. Sulriograndense, Porto Alegre, 13:93-104, 1977.
- BARNI, N.A.; GOMES, J.E.G. & GONÇALVES, N.A. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) à adubação nitrogenada no florescimento. Agron. Sulriograndense, Porto Alegre, 14:243-250, 1978.

5. BEIJERINCK, M.W. Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen. Bot. Ztg., 46:726-735, 741-750, 757-771, 781-790, 797-804, 1888.
6. BERINGER, J.E. & JOHNSTON, A.W.B. Genetics of *Rhizobium*. In: Summerfield, R.J. & Bunting, A.H., eds *Advances in Legume Science*, University of Reading. Proceedings of the International Legume Conference, Kew, 1978. p.61-78, 1980.
7. BOND, G. Root-nodule symbioses with actinomycete-like organisms. In: Quispel, A. ed. *The biology of nitrogen fixation*. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1974. p.342-380.
8. BOUSSINGAULT, J. *Agronomie, chimie agricole et physiologie*. Paris, Gauthier-Villars, 1986. v.1. 344p.
9. BROCKWELL, J.; DIATLOFF, A.; ROUGHLEY, R.J. & DATE, R.A. Selection of *Rhizobia* for inoculants. In: Vincent, J.M., ed *Nitrogen fixation in legumes*. Proceedings of an International Seminar. New York, Academic Press, 1982. p.173-188.
10. BURNS, R.C. & HARDY, R.W.F. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*. Berlin, Springer-Verlag, 1975. 189p.
11. CAMPO, R. & SFREDO, G. O nitrogênio na cultura da soja. Londrina, Centro Nacional de Pesquisa da Soja, EMBRAPA. 1981. (Informe Técnico)
12. CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de fatores biológicos e não biológicos sobre a nodulação e fixação do N₂. IPAGRO/UFRGS - MIRCEN, Porto Alegre. Curso em tecnologia Rizóbio/Leguminosas, 1980 (não publicado).
13. CHOUDURY, M.S. & DATA, A.L. Biological nitrogen fixation as a criterion for soybean breeding: Preliminary results. In: Graham, P.H. & Harris, S.C. *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture: papers presented at a workshop held at CIAT*. 1981. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. p.45-48.
14. DATE, R.A. & HALLIDAY, J. Relationship between *Rhizobium* and tropical forage legumes. In: Summerfield, R.J. & Bunting, A.H. eds. *Advances in legume science*. Kew, University of Reading, Proceedings of the International Legume Conference, 1980. p.597-601.
15. DAZZO, F.B. Infection processes in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: Summerfield, R.J. & Bunting, A.H. eds. *Advances in legume science*. Kew, University of Reading, Proceedings of the International Legume Conference. p.49-59. 1980.
16. DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using 15N. Pl. Soil, The Hague, 88:333-43, 1985.
17. DUQUE, F.F.; SALLES, L.T.G.; PEREIRA, J.C.; DÖBEREINER, J. Influence of plant genotype on some parameters of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: Graham, P.H. & Susan, S.C. eds *Biological nitrogen fixation technology for tropical*

- agriculture: Papers presented at a workshop held at CIAT, 1981. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.63-66.
18. EAGLESHAM, A.R. Priorities on strain selection. In: Freire, J.R.J. & Falcão, C.F.B. eds. *Proceedings of the Workshop on Rhizobium/Legume Inoculants*. Porto Alegre, RS. 1985. p.239-253.
19. EVANS, H.J. (ed.). *Enhancing biological nitrogen fixation*. Proceedings of a Workshop, 1982, National Academy of Sciences, 1975. 52p.
20. FAO. *Legume inoculants and their use*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United States, 1984. 63p.
21. FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & MCCOY, E. *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madison, 1932. 342p.
22. FREIRE, J.R.J. Legume inoculant quality control. In: Freire, J.R.J. & Falcão, C.F.B., eds *Proceedings of the Workshop on Rhizobium/Legume Inoculants*. Porto Alegre, 1985. p.139-144.
23. FREIRE, J.R.J. & VIDOR, C. *Rizobiologia - Estudos no Rio Grande do Sul*. In: Myasaka, S. & Medina, J.C., eds *A soja no Brasil*, Campinas, 1981. p.417-425.
24. FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA, J.S.; KOLLING, I. & MENDES, N. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 7:47-53, 1983.
25. GIBSON, A.H. Host determinants in nodulation and nitrogen fixation. In: Summerfield, R.J. & Bunting, A.H. eds. *Advances in legume science*, Kew, University of Reading. Proceedings of the International Legume Conference. 1980. p.61-67.
26. GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a Review. *Field Crops Res.*, Amsterdam, 4:93-112, 1981.
27. GRAHAM, P.H. Plant factors affecting symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: Graham, P.H. & Harris, S.C., eds *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture: papers presented at a Workshop held at CIAT*, Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.27-28.
28. GRAHAM, P.H. Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: Alexander, M. ed. *Biological nitrogen fixation ecology, technology and physiology*. New York, Plenum Press, 1982. p.75-98.
29. GRAHAM, P.H. & TEMPLE, S.R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. In: Hardarson, G. & Lie, T.A. eds *Breeding legumes for enhanced symbiotic nitrogen fixation*. Proceedings of a FAO/IEAA Consultants Meeting, Viena, 1983. *Plant and Soil*, vol. 82(3), 1984. 438p.
30. HALLIDAY, J. Principles on *Rhizobium* strain selection. In: Alexander, M. ed *Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology*. New York, Plenum Press, 1984. p.155-172.

31. HARDARSON, G. & LIE, T.A. (eds) Breeding legumes for enhanced symbiotic nitrogen fixation. Proceedings of a FAO/IEAA Consultants Meeting, Viena, 1983. Plant and Soil, vol. 82(3), 1984. 438p.
32. HELLRIEGEL, H. Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote? Ztschr. der Rübenzucker-Industrie des Deutschen Reichs, 36:863-877, 1886.
33. HELLRIEGEL, H. & WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Ztschr. der Rübenzucker-Industrie des Deutschen Reichs, 234pp., 1888.
34. JORDAN, D.C. Family III: Rhizobiaceae, Conn 1938. In: Krieg, N.R.; Holt, J.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, London, Williams & Wilkins, 1984.
35. KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S. & WEBER, D.F. Fast growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. Science, 215: 1631-1632, 1982.
36. KOLLING, J.; SCHOLLES, D. & SELBACH, P.A. Seleção de estirpes de Rizobium para trevo subterrâneo, alfafa e cornichão. Agron. Sulriograndense, Porto Alegre, 19:103-111, 1983.
37. KONDOROSI, A. & JOHNSTON, W.B. The genetics of *Rhizobium*. In: Giles, K.L. & Atherly, A.G., eds Biology of Rhizobiaceae. New York, Academic Press, 1981. p.191-219.
38. LOPES, E.S. A evolução dos estudos de Microbiologia do Solo no Instituto Agrônomo. O Agrônomo, São Paulo, 20(11):53-72, 1974.
39. McFERSON, J.; BLISS, F.A. & ROSAS, J.C. Selection for enhanced nitrogen fixation in common beans (*Phaseolus vulgaris*). In: Graham, P.H. & Harris, S.C. eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture: papers presented at a Workshop held at CIAT, 1981. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982, p.39-44.
40. MEDEIROS, J.C. Sistemas de culturas adaptadas à produtividade, recuperação e conservação do solo. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1985.
41. MILLER, R.H. & VIDOR, C. Response of soybeans to inoculation and nitrogen fertilizers. Ohio agriculture research and development center progress report, 5-112. Columbus, The Ohio State University, 1977.
42. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Nitrogen fixation. In: Microbial Processes: Promising technologies for developing countries, 1979. p.59-79.
43. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Tropical legumes: Resources for the Future. NAS, Washington, 1979. 331p.
44. NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 6(3):267-321, 1987.

45. POSTGATE, J.R., The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge Univ. Press, 1982. 252p.
46. RODRIGUEZ, J.; FREIRE, J.R.J. & SCHRANK, I. Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. MIRCEN Journal, Dorchester 3:289-295, 1987.
47. ROUGHLEY, R.J. Production and quality control of legume seed inoculants in Australia. In: Freire, J.R.J. & Falcão C.F.B., eds. Proceedings of the Workshop on *Rhizobium*/legume inoculants. Porto Alegre, 1985, p.37-42.
48. RUSCHEL, A.P.; VOSE P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L. & SAITO, S.M.T. Field evaluation of N₂-fixation and nitrogen utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by 15N isotope dilution. Pl. Soil, Hague, 65:397-407, 1982.
49. SAIBRO, J.C. Efeito do calcário, nitrogênio e fósforo sobre a composição botânica, matéria seca e proteína de misturas de espécies forrageiras tropicais e subtropicais. (Tese de Mestrado.) Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, 1971. 171p.
50. SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Pesq. Agrop. bras., Brasília, 17(7):999-1006, 1982.
51. SILVER, W.S. & HARDAY, R.W.F. Biological nitrogen fixation in forage and livestock systems. New York, American Society of Agronomy, 1976. p.1-34. (Special Publ., 28)
52. SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in legume Rhizobium technology. Honolulu, University of Hawaii Niftal Project and MIRCEN, 1985. 387p.
53. STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation in plants. University of London, The Athlone Press., 1966. 168p.
54. STOWERS, M.D. & ELKAN, G.H. Criteria for selecting infective and efficient strains of *Rhizobium* for the use in tropical agriculture. North Carolina Agriculture Research Service, 1980. (Tech. Bul., 264)
55. STOWERS, M.D. & EAGLESHAM, A.R.J. Symbiotic properties of fast-growing *Rhizobium japonicum*. 9th. North American Rhizobium Conference, Ithaca, N.Y., 1983. 200p.
56. TRINICK, M.J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: Vincent, J.M., ed Nitrogen fixation in legumes. Sidney, Academic Press. 1982. p.229-236.
57. VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Sci. Publ., 1970. 163p.
58. VINCENT, J.M. The genus *Rhizobium*. In: STARR, M.P. et al., ed. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1981. 2284p.

59. WHITNEY, A.S. The role of legumes in mixed pastures. In: Graham, P.H. & Harris, S.C. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture: Papers presented at a Workshop held at CIAT, 1981. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.361-368.
60. WORONIN, M. Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelschwellungen. Mem Acad. Imp. Sci., St. Petersbourgh, Ser. 7, 10: no. 6, 1-13, 1886.

BIOQUÍMICA E FISILOGIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

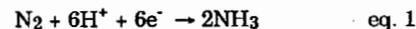
Maria Cristina P. Neves⁽¹⁾ & Norma G. Rumjaneck⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

A reação química que transforma o nitrogênio atmosférico em amônia (processo de Haber-Bosch) exige temperatura e pressão muito elevada de modo a possibilitar o rompimento da ligação tripla covalente entre os dois átomos de nitrogênio. Industrialmente, a redução do nitrogênio à amônia consome energia derivada de fontes não renováveis, como o petróleo. A nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do nitrogênio, é capaz de promover a mesma reação à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia proveniente de processos foto ou quimiossintéticos ou obtida a partir de carboidratos (fermentação ou respiração) e armazenada sob a forma de ATP.

COMO O NITROGÊNIO É REDUZIDO

A reação de redução do nitrogênio pela nitrogenase é descrita como:

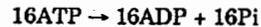


Esta reação ocorre com consumo de energia na forma de ATP, podendo ser assim equacionada:



⁽¹⁾ EMBRAPA/CNPBS, Caixa Postal 74505, km 47 da antiga rodovia Rio-São Paulo, CEP 23851 Seropédica, RJ.

Os elétrons disponíveis não são destinados somente ao nitrogênio, parte deles será utilizado na produção do hidrogênio. A formação de hidrogênio e a sua posterior evolução em alguns sistemas biológicos ainda não é bem compreendida, calculando-se, no entanto, que cerca de 25% dos elétrons disponíveis são obrigatoriamente gastos nesta conversão:



resultando na seguinte equação:



A fixação biológica do nitrogênio necessita da presença dos seguintes fatores:

Nitrogenase ativa

A nitrogenase consiste de dois componentes protéicos. O componente 1 é uma proteína tetramérica formada por 2 subunidades alfa e 2 subunidades beta com peso molecular entre 200.000 e 250.000 daltons (7). O componente 1 contém 2 átomos de molibdênio e aproximadamente 33 átomos de ferro, sendo, por isso, conhecido como MoFe-proteína. Por se ligar ao nitrogênio promovendo sua redução, este componente é chamado de dinitrogenase. O componente 2 é um dímero protéico constituído por 2 subunidades gama de peso molecular entre 57.000 e 72.000 daltons e 4 átomos de ferro, sendo, por isso, conhecido como Fe-proteína. Este componente transfere os elétrons para a MoFe-proteína e por isto é chamado de nitrogenase redutase.

A nitrogenase mais comumente encontrada é aquela que contém molibdênio e, por isso, é conhecida como nitrogenase convencional. No entanto, outras nitrogenases têm sido identificadas e são definidas como alternativas. Entre elas, a mais conhecida é a do *Azotobacter vinelandii*, onde o molibdênio da dinitrogenase foi substituído pelo vanádio (11).

Os dois componentes da nitrogenase podem ser separados, mas isoladamente não são capazes de reduzir o nitrogênio; porém, quando se misturam os dois componentes provenientes inclusive de espécies diazotróficas distintas, a atividade da enzima é recuperada.

Suprimento de energia

Conforme foi mencionado anteriormente, a reação de redução do nitrogênio consome energia, que é fornecida ao sistema enzimático sob a forma de ATP. O ATP é produzido a partir da oxidação de substratos que podem ser provenientes da fotossíntese (nódulos de leguminosa e cianobactérias) ou então substratos disponíveis no ambiente (bactéria fixadora de vida livre). A natureza química do substrato é bastante variável e é dependente do microrganismo em questão (Quadro 1).

Quadro 1. Algumas substâncias químicas passíveis de serem oxidadas por microrganismos fixadores de N_2 para obtenção de energia

| Substrato | Função química | Substância |
|----------------|------------------|----------------|
| Etanol | Alcool | Etanol |
| Glicerol | | Glicerol |
| Acetaldeído | Aldeído | Acetaldeído |
| Malonato | Ácidos orgânicos | Malonato |
| Succinato | | Succinato |
| Piruvato | | Piruvato |
| L-arabinose | Açúcar | L-arabinose |
| D-ribose | | D-ribose |
| Frutose | | Frutose |
| Glicose | | Glicose |
| Chiro-inositol | | Chiro-inositol |
| Mio-inositol | | Mio-inositol |
| Sacarose | | Sacarose |
| Trealose | | Trealose |

Geração de Redutores

A flavodoxina e a ferredoxina são doadores de elétrons para a nitrogenase *in vivo*. Estas substâncias recebem elétrons do NADH, o qual é reduzido a partir da oxidação de compostos de carbono, via cadeia respiratória ou via metabolismo anaeróbico.

ATIVADORES E INIBIDORES DE NITROGENASE

Além do nitrogênio, o complexo enzimático da nitrogenase é capaz de doar elétrons a uma série de outros substratos, tais como, óxido nítrico, acetileno, azida, cianeto, metil isocianeto e também prótons como já foi mencionado anteriormente.

O próton e o óxido nítrico atuam como inibidores competitivos do nitrogênio. Por esta razão, tem sido postulado que estes três substratos são capazes de interagir com a nitrogenase utilizando o mesmo centro ativo. Por outro lado, cianeto, azida e metil isocianeto são inibidores competitivos entre si, porém não competem com o nitrogênio, o que indica que os mesmos atuam em local diferente do centro que apresenta afinidade pelo nitrogênio.

O monóxido de carbono é um inibidor não competitivo da maioria dos substratos da nitrogenase, ou seja, atua em outro local da estrutura enzimática que não o local de interações com o substrato. No entanto, ele não apresenta nenhum efeito sobre a transferência de elétrons para os prótons, e é por isso que a evolução de hidrogênio permanece inalterada, quando em presença do monóxido de carbono. Este fato é uma indicação de que a evolução de hidrogênio não deve ocorrer no mesmo sítio de nitrogenase que apresenta afinidade pelo nitrogênio. Além disto, o hidrogênio, quando adicionado ao meio, não é capaz de interferir com a evolução de hidrogênio, porém é um inibidor competitivo do nitrogênio.

Tem sido postulado para o acetileno um sítio de ligação com a nitrogenase diferente do sítio do nitrogênio, embora os dois sejam capazes de se inibir entre si, o que tem sido creditado ao fato de os dois competirem pela mesma fonte de elétrons (24).

COMO FUNCIONA A NITROGENASE

O mecanismo de ação de redução do nitrogênio foi estudado extensivamente em *Klebsiella pneumoniae* (32). Vamos apresentar a seguir as diferentes etapas descritas.

A dinitrogenase redutase recebe o elétron fornecido pelo NADH. O elétron adquirido deverá então ser transportado para a dinitrogenase. Esta transferência de elétron necessita de energia; mais exatamente 2 moléculas de ATP devem ser consumidas para cada elétron transferido. A Fe-proteína ligada ao ATP, especificamente MgATP torna-se mais negativa e, por isso, é capaz de reduzir a MoFe-proteína (5,8).

O elétron que alcança a dinitrogenase se localiza junto ao molibdênio, permitindo a ligação entre o nitrogênio molecular e aquele átomo. As evidências indicam que o molibdênio é o centro ativo da nitrogenase (26). Um novo elétron percorre o mesmo caminho do primeiro até ser capaz de propiciar um novo grau de redução ao nitrogênio. A redução ocorre em etapas gradativas até haver a formação da amônia, a qual é então liberada e seguirá a rota metabólica característica de cada microrganismo.

O mecanismo dessa reação enzimática pode parecer, à primeira vista, bastante complexo. Porém se observarmos detalhadamente existem duas reações envolvidas, ou seja, reação de oxidação-redução e reação de transferência de energia.

As reações de oxidação-redução são reações que acarretam a transferência de elétrons. Se observarmos o trajeto do elétron ao longo das diversas etapas de funcionamento da nitrogenase, veremos que ele passa do NADH para a

ferredoxina ou flavoproteína para a Fe-proteína, em seguida para a MoFe-proteína e daí para o nitrogênio. Nesta trajetória ocorreu uma série de reações de oxidação-redução.

A reação de transferência de energia é um processo essencial para o ser vivo, pois permite que a energia obtida possa ser acumulada eficientemente e utilizada quando necessária. A energia é acumulada nas ligações químicas entre os átomos que formam a molécula, sendo que parte dessa energia pode ser transferida para outra(s) substância(s). O ATP (adenosina tri-fosfato) é uma substância altamente energética e é capaz de fornecer energia para a dinitrogenase redutase.

O CONTROLE GENÉTICO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂

Os microrganismos diazotróficos desenvolveram um sistema complexo de controle para o processo de fixação biológica de nitrogênio. Quando há disponibilidade de nitrogênio (por exemplo, NH₄⁺, NO₃⁻, aminoácidos, etc), a biossíntese da nitrogenase é reprimida. A nitrogenase é sintetizada apenas quando não há outra fonte de nitrogênio disponível.

Os genes responsáveis pelo funcionamento da nitrogenase (*nif*) em *Klebsiella pneumoniae* formam um conglomerado contendo 17 genes organizados em 8 operons. Os genes *nif H*, *nif D* e *nif K* codificam as duas subunidades da nitrogenase. Outros genes estão envolvidos na formação dos compostos da cadeia de transporte de elétrons específica para a dinitrogenase redutase e na síntese do cofator FeMo da dinitrogenase.

Os produtos dos genes *nif L* e *nif A* regulam a transcrição dos operons *nif*, através de um intrincado mecanismo de dupla cascata, envolvendo não só os genes L e A, como também os genes responsáveis pelo controle do metabolismo do nitrogênio, genes *ntr A*, *ntr B* e *ntr C* (13).

Os produtos de *ntr A* e *ntr C* são necessários para ativar a transcrição dos operons de *nif L* e A. O produto de *nif A*, por sua vez, junto com o produto do *ntr A* ativam a transcrição dos demais operons dos genes *nif*. A repressão por nitrogênio é mediada pelo produto de *nif L* (que inativa o produto de *nif A*) e pelo produto de *ntr B* (que inativa o produto de *ntr C*). O produto de *nif L* também está envolvido no mecanismo de repressão pelo oxigênio através da inativação do produto de *nif A* (Figura 1).

Nos sistemas simbióticos, o controle genético é bem mais complexo. Já foram descritos pelo menos 50 genes que participam do processo simbiótico. Estes genes estão contidos em plasmídeos (elementos genéticos autônomos, cons-

tituídos por um segmento circular de DNA) e também no cromossoma da bactéria. Além disto, pelo menos vinte genes da planta estão envolvidos no estabelecimento da simbiose.

Perdas totais ou parciais da habilidade de fixar nitrogênio são freqüentes em microrganismos sob cultivo em laboratório; principalmente em alguns microrganismos nos quais os genes *nif* são localizados em *plasmídeos*, como é o caso de algumas espécies de rizóbio de crescimento rápido. Estes plasmídeos podem ser facilmente perdidos pela bactéria, após exposições a tratamentos térmicos suaves (35-40 °C).

A NECESSIDADE DE EXCLUIR O OXIGÊNIO

A sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio, que pode destruir irreversivelmente a enzima, representa um grande problema de ordem fisiológica para a maioria dos microrganismos diazotróficos, com exceção daqueles capazes de metabolismo anaeróbico como por exemplo o *Clostridium pasteurianum*, um anaeróbio obrigatório.

A nitrogenase não funciona na presença de oxigênio e os microrganismos capazes de metabolismo aeróbico, que energeticamente é muito mais eficiente do que o metabolismo anaeróbico, desenvolveram várias estratégias para proteger a nitrogenase do oxigênio.

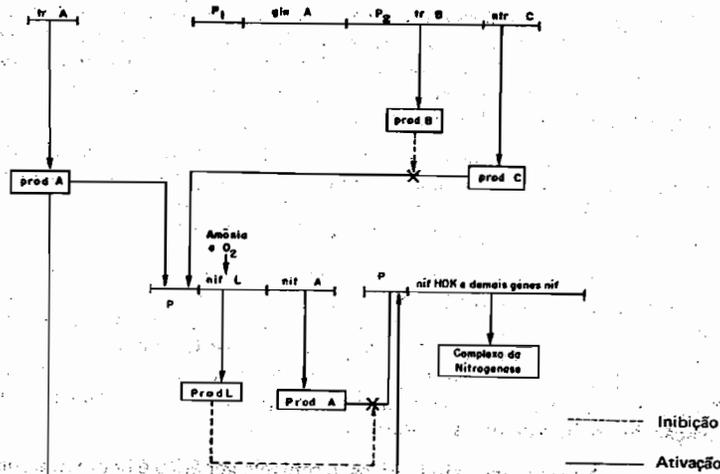


Figura 1. Controle genético da nitrogenase em *Klebsiella pneumoniae* (modificado de Merrick e Dixon, 1973).

Bactérias diazotróficas anaeróbicas facultativas, como por exemplo, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacillus*, fixam nitrogênio apenas sob condições anaeróbicas ou muito limitadas de oxigênio (23).

Muitos diazotróficos de vida livre, como por exemplo os dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, etc., quando supridos com nitrogênio combinado crescem aerobicamente, mas fixam nitrogênio apenas quando a taxa de dissolução do oxigênio no ambiente aquoso se iguala à taxa de consumo pela respiração, ou seja, fixam em microaerofilia. Através da respiração, diminuem o nível do oxigênio que poderia danificar a nitrogenase (2). Bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que se pensava capazes de fixar nitrogênio apenas em condições simbióticas com a planta superior, podem, entretanto, fixar nitrogênio em vida livre desde que em condições microaerófilas (9).

Alguns microrganismos aeróbicos desenvolveram mecanismos especiais de proteção para a nitrogenase que permitem o crescimento em presença de oxigênio.

Proteção respiratória: espécies do gênero *Azotobacter* são muito bem adaptadas à fixação de nitrogênio em condições aeróbicas. Nestas espécies a respiração desenvolve uma função protetora. Taxas respiratórias excepcionalmente altas são observadas, servindo para eliminar o oxigênio do sítio da fixação. Para evitar excessiva produção de ATP, uma via respiratória de pouca eficiência é usada sempre que a proteção respiratória é necessária (25), gerando cerca de 1/3 do ATP que poderia ser formado pela via respiratória normal.

Produção de exopolissacarídeos: a produção de exopolissacarídeos (muco) tem sido apontada como uma forma de proteção ao oxigênio. Densa camada de muco se forma envolvendo as colônias de *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Derxia gummosa*, restringindo a difusão do oxigênio até às bactérias no interior da colônia (2). Entretanto algumas estirpes não produzem goma e nem por isso possuem maior sensibilidade ao oxigênio, de modo que o papel real dos exopolissacarídeos necessita ser investigado.

Proteção Conformacional da Nitrogenase: As espécies de *Azotobacter* apresentam também um mecanismo de proteção conformacional da nitrogenase. Nestes organismos a nitrogenase se encontra numa fração micro-particulada juntamente com uma proteína que é capaz de se ligar ao sítio sensível a oxigênio, impedindo assim a inativação. Este mecanismo confere às bactérias a capacidade de "ligar" e "desligar" a nitrogenase. Ou seja, sempre que as condições de oxigenação excederem a capacidade protetora da respiração, a nitrogenase é "desligada" através do bloqueio do sítio da nitrogenase pela proteína. Assim que as condições favoráveis são restabelecidas a nitrogenase é "ligada" através do desacoplamento da proteína (25).

Heterocistos: nas cianobactérias, o processo fotossintético é semelhante ao das plantas superiores, ou seja, os elétrons são obtidos através da fotólise da água gerando oxigênio. Enquanto que algumas espécies (por exemplo, *Plectonema*) simplesmente separam no tempo os dois processos fisiologicamente incompatíveis, fixando nitrogênio apenas em condições microaerofílicas quando a iluminação é baixa e o processo fotossintético cessa, outras espécies (por exemplo, *Anabaena*) mais bem adaptadas às condições aeróbicas desenvolveram células especializadas, chamadas heterocistos que desaparecem sempre que existe amônia disponível no meio (29).

Nestas espécies a nitrogenase só ocorre nos heterocistos. As células vegetativas possuem todas as enzimas responsáveis pelo processo fotossintético e evoluem oxigênio, enquanto que nos heterocistos o componente responsável pela evolução de oxigênio (fotossistema II) é ausente. Deste modo não há redução de dióxido de carbono pelos heterocistos, mas eles são capazes de fotofosforilação (30). Além disto, a grossa parede celular dos heterocistos restringe a difusão do oxigênio do meio externo. A troca gasosa se dá por um pequeno orifício que liga os heterocistos às demais células vegetativas, mantendo condições microaerofílicas ao redor da nitrogenase.

Associações com outros organismos: Muitos diazotróficos são capazes de formar associações com outros organismos que os ajudam a consumir o oxigênio criando, deste modo, ambientes favoráveis à fixação de nitrogênio.

As associações dos diazotróficos podem incluir outros microrganismos [como os fungos, formando líquens (14)] e os vegetais superiores. Alguns diazotróficos apenas se beneficiam da proximidade de uma raiz (por exemplo, *Azotobacter* na rizosfera de *Paspalum notatum*), outros são capazes de penetrar no interior das raízes (como o *Azospirillum* em cereais) enquanto que os diazotróficos mais especializados (como o rizóbio com as leguminosas e *Frankia* com não-leguminosas como a *Casuarina*) formam estruturas especializadas, onde a difusão do oxigênio é bastante limitada.

Leg-hemoglobina: Nas associações de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* com leguminosas ocorre a formação de **nódulos radiculares**, os bacteróides do rizóbio são envolvidos por membranas de origem vegetal formando os **envolopes membranosos** que contêm um pigmento vermelho chamado **leg-hemoglobina**, semelhante à hemoglobina do sangue. Tal como a proteína do sangue, sua função é transportar o oxigênio, porém sua alta afinidade com o oxigênio faz com que seja capaz de liberar o oxigênio para o bacteróide, em concentrações nunca prejudiciais à nitrogenase, representando uma forma de sistema-tampão para oxigênio (1). Os nódulos radiculares das leguminosas são, desse modo, compartimentos altamente especializados, onde a fixação de nitrogênio e o processo de respiração aeróbica foram fisiologicamente compatibilizados.

CUSTO ENERGÉTICO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

A capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, característica dos microrganismos *diazotróficos*, confere vantagens competitivas nos ambientes onde este elemento é limitante. A fixação biológica do nitrogênio, entretanto, é um processo que consome muita energia que é usada principalmente para romper as ligações triplas, as quais conferem grande estabilidade à molécula de nitrogênio. A redução de 1 mol de nitrogênio e a concomitante evolução de 1 mol de hidrogênio apresenta um requerimento direto de 16 moles de ATP (eq. 2).

O consumo de elétrons durante a redução de 1 mol de nitrogênio representa um dreno de energia da ordem de 12 moles de ATP, assumindo-se que, se não fossem usados pela nitrogenase, os elétrons poderiam gerar 3 moles de ATP por par, através da fosforilação oxidativa. No total, a fixação biológica de nitrogênio teria um custo teórico equivalente a 28 moles de ATP por mol de nitrogênio fixado.

A evolução de hidrogênio representa uma ineficiência do sistema, uma vez que consome elétrons e ATP para formar hidrogênio. A quantidade de hidrogênio evoluído varia muito entre os diversos microrganismos, podendo variar também com as alterações nas condições ambientais e fisiológicas (20), sendo que, na ausência completa de nitrogênio, todos os elétrons disponíveis à nitrogenase são usados na redução de prótons gerando hidrogênio. Alguns diazotróficos podem, porém, oxidar o hidrogênio produzido através da enzima hidrogenase que atua unidirecionalmente e pode recuperar parte da energia e dos redutores desperdiçados no processo de evolução de hidrogênio.

CUSTO ENERGÉTICO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR DIAZOTRÓFICOS DE VIDA LIVRE

Os microrganismos diazotróficos existem em virtualmente todas as categorias metabólicas. A maioria porém, é quimiorganotrófica aeróbica facultativa ou anaeróbica obrigatória.

O custo energético da fixação do nitrogênio pode ser facilmente obtido em culturas puras, relacionando o consumo de carbono com o aumento na quantidade de nitrogênio. O custo dependerá principalmente do caminho metabólico usado na geração do ATP (Capítulo 16). O consumo de carbono por diazotróficos aeróbicos pode chegar a 190 gramas de carbono por grama de nitrogênio fixado, enquanto que os anaeróbicos e os facultativos consomem até 300 gramas de carbono por grama de nitrogênio fixado (18).

O consumo de carbono na proteção respiratória da nitrogenase diminui consideravelmente a eficiência dos organismos (cerca de 80% de diminui-

ção). Desse modo maiores eficiências dos aeróbios podem ser observadas em ambientes com oxigênio limitado.

Estes valores obtidos no laboratório em culturas puras estão longe, porém, de retratar o funcionamento destes sistemas nas condições naturais. De um modo geral, a eficiência da fixação de nitrogênio é maior em solos anaeróbios do que nos muito aerados, alcançando valores entre 28 e 35 gramas de carbono por grama de nitrogênio fixado, em solos suplementados com uma fonte de carbono. A disponibilidade de fontes de carbono no solo é, entretanto, pequena, principalmente em solos tropicais, limitando a ação dos diazotróficos quimiorgrano-tróficos de vida livre.

A colonização da rizosfera das plantas por diazotróficos é bastante comum. A rizosfera representa um sítio ecológico favorável à fixação biológica de nitrogênio, não só por apresentar disponibilidade de substratos de carbono devido aos exsudatos radiculares, mas também por manter baixas taxas de oxigênio devido à respiração das raízes e demais microrganismos da rizosfera.

CUSTO ENERGÉTICO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SISTEMAS SIMBIÓTICOS

A associação dos diazotróficos com outros microrganismos, como ocorre nos líquens ou com animais e plantas superiores, é bastante comum (27).

Diversas estimativas do custo *in vivo* da fixação de nitrogênio em leguminosas e em plantas associadas a *Frankia* já foram publicadas, e os valores variam de 1 até 8 gramas de carbono por grama de nitrogênio fixado, dependendo da espécie da planta, condições experimentais e do manejo das plantas (18).

A simbiose das leguminosas com o rizóbio é, entretanto, a mais estudada. Nesta simbiose, o desenvolvimento e a manutenção dos nódulos, assim como a assimilação do nitrogênio fixado representa um gasto para a planta hospedeira, e o custo total do funcionamento dos nódulos chega a consumir entre 13 e 28% dos produtos fotossintetizados pela planta (15;16;17;21). Estes produtos são rapidamente transportados para os nódulos, de tal forma que manipulações na quantidade de produtos da fotossíntese disponíveis geralmente provocam alterações correspondentes na atividade dos nódulos, a não ser que o sistema esteja limitado por outros fatores.

Apesar do maior custo energético envolvido no processo de fixação biológica de nitrogênio nas leguminosas em relação à assimilação do nitrogênio mineral (a redução de nitrato consome também muita energia; quando, porém, é processada nas folhas, usa excedentes de energia e redutores produzidos durante a fotossíntese, sem custo adicional para a planta), algumas leguminosas efetiva-

mente noduladas raramente respondem à aplicação de fertilizantes nitrogenados em experimentos de campo. Tal fato pode ser devido à baixa eficiência na recuperação do fertilizante pelas plantas. Em regiões tropicais esta recuperação pode ser de apenas 10% (6), chegando excepcionalmente a 50% do nitrogênio aplicado. Além disso, em leguminosas como feijão, feijão de corda (caupi) e soja, o processo de fixação biológica de nitrogênio promove uma melhor distribuição do nitrogênio na parte aérea das plantas, favorecendo a produção de grãos (19). Deste modo, o maior custo do processo biológico é contrabalançado por um melhor aproveitamento do nitrogênio fixado.

TRANSFERÊNCIA DO NITROGÊNIO FIXADO NAS ASSOCIAÇÕES FIXADORAS DE N₂

Os diazotróficos de vida livre fixam o nitrogênio apenas para suprir suas necessidades de proteínas, indispensáveis à multiplicação celular. A amônia produzida é assimilada sob a forma de glutamina, através das enzimas glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase. Os diazotróficos que vivem em simbiose com outros organismos, porém, transferem parcial ou totalmente para o hospedeiro o nitrogênio que fixam.

Nas associações de cianobactérias com fungos formando líquens, o fungo modifica o mecanismo assimilador de amônia da cianobactéria e, deste modo, cerca de 95% da amônia produzida é excretada pela cianobactéria e assimilada pelo fungo (22).

O mesmo ocorre na associação das cianobactérias com *Azolla/Anabaena*, onde não só a quantidade mas também a atividade das enzimas assimiladoras de amônia são bem menores do que as apresentadas pela cianobactéria em vida livre (22). O nitrogênio fixado pela cianobactéria é então excretado e assimilado pela *Azolla*.

As enzimas de assimilação da amônia são também suprimidas ou ausentes em *Frankia* em simbiose com não-leguminosas, e a amônia produzida é excretada e assimilada no citoplasma das células nodulares da planta hospedeira, tal como ocorre nos nódulos da simbiose das leguminosas com rizóbio. Nas associações envolvendo plantas superiores, o nitrogênio assimilado nos nódulos é, então, transportado para as demais partes da planta hospedeira através do xilema. Nas associações actinorrízicas, os principais compostos nitrogenados que deixam os nódulos são amidas, citrulina e serina, sendo que a citrulina predomina (80% do total) em *Alnus* enquanto que as amidas predominam em *Myrica* (31). Um esquema geral do processo de assimilação e transporte é apresentado na figura 2.

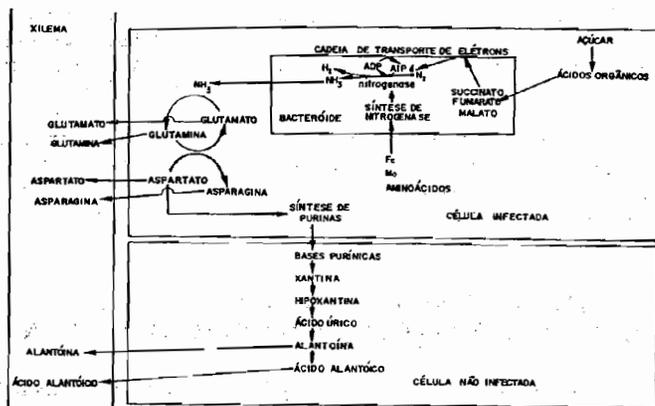


Figura 2. Vias metabólicas dos principais compostos nitrogenados produzidos pelos nódulos e exportados pelo xilema para nutrição da parte aérea da planta.

A SIMBIOSE DO RIZÓBIO COM AS LEGUMINOSAS

O rizóbio, sob a forma de bacteróide, presente no interior de células infectadas dos nódulos radiculares de leguminosas, possui as enzimas assimilativas para a amônia, tal como a bactéria em vida livre. Estas enzimas, porém, estão presentes em concentrações muito baixas, de modo que a amônia produzida é exportada pelo bacteróide para a célula vegetal infectada que contém grandes quantidades de enzimas assimilatórias da amônia, principalmente glutamina sintetase e glutamato sintetase (3). As evidências sugerem que a etapa inicial da assimilação da amônia está relacionada com a síntese de glutamina, via glutamina sintetase e glutamato sintetase. Porém, ao contrário da bactéria de vida livre, o citosol da célula vegetal nodular apresenta a glutamato desidrogenase bastante ativa, fato este que ainda não pode ser bem compreendido (1). A glutamina é utilizada como substrato para síntese dos diversos aminoácidos, amidas e ureídeos (alantóina e ácido alantóico), que são os principais compostos exportados pelos nódulos, sendo que os ureídeos predominam nas espécies pertencentes à tribo Phaseoleae (soja, feijão, feijão de corda, etc.) (10;20) e as amidas predominam nas espécies de *Clavulaceae*, especialmente as pertencentes à tribo Viciaeae e Trifolieae (ervilha, fava, lentilha, trevo, etc.) (28). A síntese de ureídeos é muito complexa, se comparada com a formação dos aminoácidos. Ela envolve a síntese de inosina 5-fosfato através das enzimas de síntese da purina e posterior degradação até alantóina e ácido alantóico que ocorre nas células não infectadas do nódulo.

Resta uma pergunta: o que mantém o rizóbio em associação com a célula vegetal? Pelo que existe de informação até o momento, sabe-se que a amônia fixada é imediatamente eliminada, e os compostos de carbono que alcançam o nódulo são oxidados de forma a prover energia e elétrons para a manutenção da nitrogenase ativa (4). Mais recentemente, um modelo foi sugerido no qual o nitrogênio a ser utilizado pelo bacteróide deve ser fornecido pela planta, que deste modo poderia controlar eficientemente o crescimento do bacteróide. O nitrogênio a ser transferido para a planta deve estar sob a forma de um aminoácido, mais provavelmente o glutamato (12).

Existem outras evidências que também sugerem uma íntima interação entre células vegetal e bacteróide. Estirpes de rizóbio que contém hidrogenase são capazes de produzir seiva contendo uma fração maior de nitrogênio como ureídeo, o que tem acarretado numa maior produção de grãos (19). Embora este fato não esteja bem compreendido, é possível que o metabolismo do hidrogênio possa, de algum modo, modificar as vias de assimilação da amônia presentes na célula vegetal.

LITERATURA CITADA

1. BERGERSEN, F.J. Root nodules of legumes: structure and functions. Chichester, Research studies Press, 1982. 164p. (Botanical research studies, 1)
2. BERGERSEN, F.J. Oxygen and the physiology of diazotrophic microorganisms. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E., eds. Advances in nitrogen fixation research. Wageningen, Martinus Nijhoff, 1984. p.171-180.
3. BOLAND, M.J.; HANKS, J.F.; REYNOLDS, P.H.S.; BLEVINS, D.G.; TOLBERT, N.E. & SCHUBERT, K.R. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen fixing soybean nodules. *Planta*, New York, 155, 45, 1982.
4. DILWORTH, M.J. & GLENN, A. How does a legume nodule work? *Trends Biochem. Sci.*, 9(12):519-523, 1984
5. DILWORTH, M.J.; SUBRAMANIAN, D.; MUNSON, T.O. & BURRIS, R.H. The adenosine triphosphate requirement for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum* *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, 99:486-503, 1965.
6. DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L. & BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N_2 fixation using ^{15}N . *Pl. Soil*, Hague, 88:333-343, 1985.
7. EADY, R.R.; KAHN, D. & BUCHANAM-WOLLASTON, V. The molecular enzymology of nitrogen fixation. *Isr. J. Bot.*, Jerusalem, 31:45-60, 1982.

8. EADY, R.R.; SMITH, B.E.; COOK, K.A. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, London, 128:655-675, 1972.
9. GIBSON, A.H.; SCOWCROFT, W.R. & PAGAN, J.D. Nitrogen fixation in plants: an expanding horizon? In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.R. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., eds. Recent developments in nitrogen fixation. New York, Academic Press, 1977. p.387-417.
10. GOI, S.R. & NEVES, M.C.P. Teor de ureídos, tipo de nódulo e atividade da nitrogenase de leguminosas forrageiras, florestais e de grão. *Pesq. agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 17:43-50, 1982.
11. HALES, B.J.; CASE, E.E.; MORNINGSTAR, J.E.; DZEDA, M.F. & MAUTERER, L.A. Isolation of a new vanadium - containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, Washington, 25:7252, 1986.
12. KHAN, M.L.; KRAUS, J. & SOMERVILLE, J.E. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium* - legume symbiosis. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. & NEWTON, W.E. eds. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.193-199.
13. MERRICK, M. & DIXON, R. Why don't plants fix nitrogen? *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, 2:162-166, 1984.
14. MILLBANK, J.W. Nitrogen fixation by lichens. In: SUBBA RAO, N.S., ed. Current developments in biological nitrogen fixation. New Delhi, Oxford & IBH, 1984., p.197-213.
15. MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodule. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 24:259-271, 1973.
16. MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & NEVES, M.C.P. Carbon metabolism, nitrogen assimilation, and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown in an adverse temperature regime. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 31:1327-1345, 1980.
17. NEVES, M.C.P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium* - leguminosas. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 5:79-92, 1981.
18. NEVES, M.C.P. Energy cost of biological nitrogen fixation. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, 1982. p.77-92.
19. NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & DOBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 36:1179-1192, 1985.
20. NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, Boca Raton, 6(3):267-321, 1987.

21. PATE, J.S. & HERRIDGE, D.F. Partitioning and utilization of net photosynthate in a nodulated annual legume. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 29:401-412, 1978.
22. PETERS, G.A.; TOIA, R.E.; CALVERT, H.E. & MARSH, B.H. Lichens to *Gunnera* with emphasis on *Azolla*. *Pl. Soil*, Hague, 90:17-34, 1986.
23. POSTGATE, J.S. Nitrogen fixation. London, Edward Arnold Publishers, 1979. 68p.
24. RIVERA-ORTIZ, J.M. & BURRIS, R.H. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 123(2):537-545, 1975.
25. ROBSON, R.L. & POSTGATE, J.S. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 34:183-207, 1980.
26. SMITH, B.E. The structure and function of nitrogenase: a review of the evidence for the role of molybdenum. *J. Less-Common Metals*, 54, 465-475, 1977.
27. SPRENT, J.S. The biology of nitrogen-fixing organisms. London, McGraw-Hill, 1979. 196p.
28. SPRENT, J.S. Root nodule anatomy, type of export product, and evolutionary origin in some leguminosae. *Pl. Cell Environ.*, 3:35-43, 1980.
29. STEWART, W.D.P. Blue-Green algae. In: HARDY, R.W.F. & SILVER, W.S., eds. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley & Sons, 1977. p.63-123.
30. STEWART, W.D.P. Some aspects of structure and function in N_2 -fixing cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 34:497-536, 1980.
31. WHEELER, C.T. *Frankia* and its symbiosis in non-legume (actinorhizal) root nodules. In: SUBBA RAO, N.S., ed. Current developments in biological nitrogen fixation. New Delli, Oxford & IBH, 1984. p.173-195.
32. YATES, M.G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: The biochemistry of plants, 5, New York, Academic Press, 1980. p.1-64.

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS

Celso G. Auer⁽¹⁾ & Romildo da Silva⁽²⁾

INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies arbóreas de interesse econômico são conhecidas dentro da família das Leguminosas. A necessidade de se incluir o uso de essências nativas no programa de reflorestamento brasileiro estimulou a pesquisa sobre processos microbiológicos (fixação de nitrogênio e micorrizas) associados a essas plantas e que permitem o seu estabelecimento a baixo custo. Regiões com solos marginais apresentando baixa fertilidade ou condição semi-árida mostram condições inadequadas para culturas agrícolas, mas tornam-se potencialmente indicadas para espécies fixadoras que possuam características de rusticidade, baixo requerimento de nutrientes e resistência à seca (26,41). Aliada a estas características, pode-se também pensar em uma melhor exploração do solo e adequada absorção de nutrientes com o auxílio das associações micorrízicas, normalmente presentes em árvores (13).

ASSOCIAÇÕES COM RIZÓBIO EM LEGUMINOSAS

Nodulação em Raízes.

A maioria das leguminosas arbóreas forma nódulos em raízes, existindo uma grande diversidade de espécies formadoras entre as subfamílias de Leguminosae (Quadro 1). Os estudos com espécies nativas brasileiras confirmam

⁽¹⁾ Patologia Florestal, CNPF/EMBRAPA, Caixa Postal 3319, CEP 80001 Curitiba, PR.

⁽²⁾ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36500 Viçosa, MG.

Quadro 1. Ocorrência de nodulação em subfamílias de essências florestais de interesse para o Brasil

| Subfamília | Conhecidas | Espécies | | | |
|-----------------|-------------|------------------|----|-----------------|----|
| | | Observadas | | Não nodulíferas | |
| | | Nodulíferas a | b | a | b |
| Caesalpinoideae | 1873-1923 | 53 | 8 | 120 | 12 |
| Mimosoideae | 2500-2900 | 351 | 26 | 37 | — |
| Papilionoideae | 12215-12792 | 2416 | 28 | 47 | 2 |

a: Allen & Allen (2).

b: Adicionados por Campello (12); Faria et al. (23); Magalhães et al. (28); Ribeiro Júnior (34) e Vasconcelos (41).

a carência de informações pois, a cada trabalho de levantamento em ecossistemas naturais, surgem informações sobre novas leguminosas arbóreas com nodulação (Quadros 1 e 2). Em condições tropicais, cerca de 97% das plantas em Caesalpinoideae, 95% em Mimosoideae e 38% em Papilionoideae são árvores (2; 28). A enorme quantidade de espécies contidas neste grupo possibilita uma diversidade de exploração (Quadro 1 do capítulo 9), sendo importantes para a produção de celulose e papel, energia, forragem, adubação verde, madeira, alimento para o homem, sombreamento, reflorestamento (21) e revegetação em áreas degradadas (14,29). A utilização de essências florestais noduladoras deve receber maior preferência para os trabalhos de reflorestamento, pois mudas eficientemente inoculadas e bem noduladas mostram melhor estabelecimento no campo e crescimento mais rápido. A existência de inoculantes e o desenvolvimento de sistemas de produção de mudas torna possível o emprego de leguminosas como *Leucaena* e *Prosopis*, na Silvicultura (16,23,25,26).

Nodulação em Caule

A nodulação no caule foi primeiramente relatada nos gêneros *Aeschynomene* e *Sesbania* e na aquática *Neptunia*. Até o presente momento, todas as leguminosas encontradas com esse tipo de nodulação pertencem somente aos três gêneros descritos. A outra característica comum a esse grupo é a habilidade para crescer em solos inundados. Neste habitat, os nódulos surgem nos caules submersos, ao nível da linha de água e em raízes adventícias. A quantidade de nódulos formados é grande, em comparação com as leguminosas cultivadas (cerca de cinco a dez vezes mais com *Sesbania*), de modo que a taxa de fixação de nitrogênio por indivíduo é alta (17,36). A importância desse grupo está relacionada com o seu aproveitamento como adubo verde ou forragem em áreas alagadas (18). *Sesbania* fixa até 200 kg N/ha.ano.

Quadro 2. Novas leguminosas arbóreas noduladas detectadas na Região Sudeste do Brasil

| Subfamília | Gêneros | Número de espécies |
|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Caesalpinoideae | <i>Dimorphandra</i> | 1 |
| | <i>Sclerolobium</i> | 2 |
| | <i>Tachigalia</i> | 1 |
| Mimosoideae | <i>Acacia</i> | 1 |
| | <i>Albizia</i> | 1 |
| | <i>Anadenanthera</i> | 1 |
| | <i>Affonsea</i> | 1 |
| | <i>Calliandra</i> | 1 |
| | <i>Enterolobium</i> | 1 |
| | <i>Inga</i> | 6 |
| | <i>Mimosa</i> | 4 |
| | <i>Newtonia</i> | 1 |
| | <i>Piptadenia</i> | 1 |
| | <i>Pithecellobium</i> | 3 |
| Papilionoideae | <i>Andira</i> | 4 |
| | <i>Centrolobium</i> | 1 |
| | <i>Ciclotobium</i> | 1 |
| | <i>Dalbergia</i> | 4 |
| | <i>Derris</i> | 1 |
| | <i>Erythrina</i> | 1 |
| | <i>Lonchocarpus</i> | 4 |
| | <i>Machaerium</i> | 6 |
| <i>Ormocarpum</i> | 1 | |
| <i>Swartzia</i> | 1 | |

Referência: Franco & Silva (25).

ESPÉCIES ARBÓREAS NÃO LEGUMINOSAS

Algumas árvores fora da família das Leguminosas possuem associação com o rizóbio. Uma delas é a *Parasponia*, um gênero da família Ulmaceae, ordem Urticales, a qual anteriormente era denominada de *Trema*. Esta árvore apresenta hábitos de planta pioneira, claramente demonstrados pelo crescimento e colonização de solos originados de atividade vulcânica e solos virgens de montanhas com altitude de 1500 a 1800 m, na Indonésia (8). O gênero, que distribui-se também pela Malásia e Polinésia, apresenta apenas *P. andersonii*, *P. parviflora* e *P. rugosa* descritas como formadoras de nódulos (10). A bactéria associada não parece ser específica ao gênero *Parasponia*, pois forma nódulos com espécies leguminosas, tais como *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum* (7).

Outros gêneros de plantas não leguminosas estão na família Zygophyllaceae. Esta família ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, consistindo de vegetação xerofítica e halofítica lenhosa e perene. As espécies descritas pertencem aos gêneros *Zygophyllum*, *Tribulus* e *Fagonia*. *Zygophyllum* distribui-se pelos desertos e estepes que se estendem desde o Mediterrâneo até a Ásia Central, e também no sul da África e Austrália. A área de ocorrência de *Tribulus* é o sul dos EUA, enquanto que *Fagonia* ocorre em desertos do Egito (10). A estrutura interna dos nódulos de *Parasponia* possui certas particularidades, como uma zona apical meristemática que produz contínuo alongamento dos nódulos. Os nódulos tornam-se coralóides, de forma similar aos de *Alnus-Frankia*, porém com forma mais irregular, nem sempre de ramificação dicotômica e com base estreita no ponto de ligação com a raiz principal. *Parasponia* apresenta nódulos facilmente destacáveis de forma similar ao de algumas leguminosas (8). A importância econômica de *Parasponia* está em seu uso para: sombreamento de culturas agrícolas como café, cacau e chá; produção de madeira para mourões de cerca e fibras para celulose e papel (22). Para *Zygophyllum*, *Tribulus* e *Fagonia* seu principal potencial de uso é a revegetação de áreas desérticas, fixação de dunas e plantio consorciado com culturas agrícolas em regiões semi-áridas. A contribuição da fixação neste grupo é encontrada apenas para *Parasponia* (Quadro 3).

FORMAÇÃO DOS NÓDULOS PELO RIZÓBIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS

A análise dos nódulos formados pelo rizóbio, entre as diversas espécies de plantas leguminosas e não leguminosas, apresenta algumas diferenças

Quadro 3. Estimativas de fixação anual de nitrogênio em árvores tropicais

| Espécie | Região | Nitrogênio fixado kg ha ⁻¹ ano ⁻¹ |
|--------------------------------|------------------------|--|
| Leguminosas | | |
| <i>Acacia mearnsii</i> | Terras tropicais altas | 200 |
| <i>A. holosericea</i> | Área degradada - mina | 6,4 |
| <i>A. penatula</i> | | 34,3 |
| <i>Gliciridia sepium</i> | | 12,9 |
| <i>Inga jinicuil</i> | Sombra para café | 35,0 |
| <i>Leucaena larisiliqua</i> | Trópico úmido | 500 |
| <i>L. leucocephala</i> | Trópico úmido | 200-600 |
| Não leguminosas | | |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | Zona árida | 58 |
| <i>C. littoralis</i> | Trópico úmido | 218 |
| <i>Parasponia</i> | Trópico úmido | 850 |

Referência: Döbereiner (16) e Franco & Silva (25).

importantes quanto ao ponto de vista morfológico, ecológico e funcional. A diferença na morfologia dos nódulos é função do tipo de infecção e colonização promovida pela bactéria, durante o desenvolvimento da simbiose e da resposta do hospedeiro à infecção. A existência de estirpes da bactéria, reflexo da variabilidade genética, resulta na especificidade de infecção a determinados grupos de plantas hospedeiras compatíveis, para a ocorrência da infecção e simbiose (1). Os locais da planta onde ocorrem os processos de infecção e formação de nódulos são denominados sítios de nodulação e estão intimamente ligados à evolução da relação simbiótica. Na natureza são encontrados sítios de nodulação em raízes de solo e adventícias e em caules de determinadas árvores (Quadro 4). Estudos recentes têm demonstrado a existência de uma adaptação na fixação biológica do nitrogênio, entre bactérias e árvores. Aparentemente, as plantas formadoras de nódulos no caule seriam as mais evoluídas, em relação às formadoras de nódulos somente em raízes. As árvores formadoras de nódulos em raízes e caule, simultaneamente, são caracterizadas por possuírem habitat semi-aquático a aquático, tendo como adaptação a formação de raízes aéreas (adventícias) para sobrevivência em períodos de inundação. Esta modificação no sistema radicular foi acompanhada por uma adaptação dirigida da bactéria em sua ecologia de nodulação, para infecção e nodulação nos pontos de origem de raízes adventícias ou junto às mesmas. No caule esses pontos, denominados de primórdios de raízes, são infectados diretamente pela bactéria, ou através de vetores durante os períodos de inundação. Dentre o grupo de árvores fixadoras em caule, as espécies consideradas

Quadro 4. Classificação de árvores fixadoras de nitrogênio quanto ao tipo de sítio de nodulação e de fixação por *Rhizobium*

| Nódulos em raízes |
|--|
| Fixação intercelular |
| Células bacterianas fixadoras em cordões de infecção |
| Árvores leguminosas: <i>Andira</i> |
| Árvores não leguminosas: <i>Parasponia</i> e família Zygophyllaceae |
| Fixação intracelular |
| Bacteróides dentro de células infectadas |
| Ocorrência na maior parte das leguminosas arbóreas. Ex. <i>Albizia</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Mimosa</i> , etc. |
| Nódulos em raízes e caule |
| Fixação intracelular em árvores leguminosas |
| Nódulos formados na base de raízes adventícias e sem cloroplastos: Gênero <i>Neptunia</i> |
| Nódulos originados de primórdios radiculares do caule e presença de cloroplastos |
| a) Zona meristemática do primórdio invadida por cordão de infecção: Gênero <i>Aeschynomene</i> |
| b) Zona meristemática do primórdio invadida por infecção direta e por cordão de infecção: Gênero <i>Sesbania</i> |

Referência: Akkermans & Howers (1); Dreyfuss et al. (17) e Faria et al. (24).

mais evoluídas são *Aeschynomene afraspera* e *Sesbania rostrata*, por apresentarem nódulos contendo cloroplastos que fazem fotossíntese. Os menos evoluídos, deste grupo, seriam *A. elaphroxylon* e *Neptunia oleracea* (17). O aspecto adaptativo da fixação também pode ser discutido com base no tipo de interação entre a bactéria e o sítio de fixação dentro do nódulo (Figura 1). As árvores pertencentes

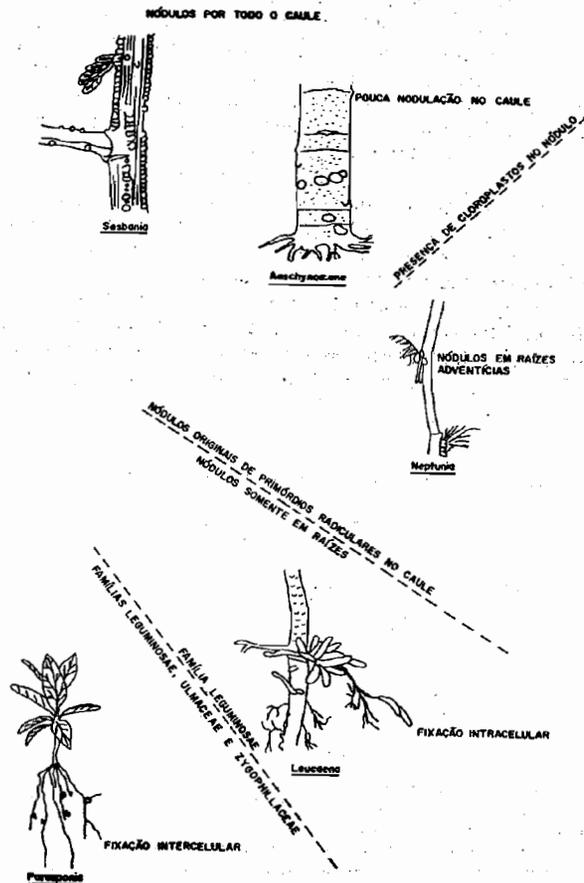


Figura 1. Adaptação de simbiose planta hospedeira - *Rhizobium*. Fonte: Faria et al. (23) e reimpressão da figura 1A, C e D - Dreyfuss et al. (17) com permissão da American Society for Microbiology.

aos gêneros *Andira* e *Parasponia* possuem nódulos considerados como primitivos, pois a célula bacteriana fica retida no cordão de infecção intercelular, sendo provável este local como o sítio de fixação do nitrogênio (24). Todas as outras leguminosas apresentam o processo intracelular de fixação. O cordão de infecção, constituído pelas bactérias, promove a passagem das mesmas para o interior das células do hospedeiro, no que são encapsuladas e envoltas por uma membrana. A célula bacteriana pára seu crescimento e torna-se estática assumindo uma forma denominada bacteróide. Nesta fase ocorre a fixação do nitrogênio, a qual é facilitada pelo contato íntimo entre as células dos simbiontes (Figura 2).

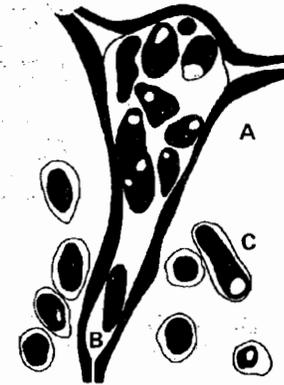


Figura 2. Distribuição da bactéria *Rhizobium* dentro do nódulo em leguminosas. Células da raiz (A) recebem a célula bacteriana liberada pelo cordão de infecção (B). A célula de *Rhizobium* é encapsulada individualmente (C) tornando-se em bacteróide. Fonte: Dreyfuss et al. (18).

ASSOCIAÇÕES COM FRANKIA

A estrutura responsável pela captação do nitrogênio atmosférico em plantas leguminosas é o nódulo, que contém bactérias do grupo *Rhizobium*. Em plantas não leguminosas pode haver a fixação biológica do nitrogênio pelo rizóbio e pelo actinomiceto *Frankia*, este último formando nódulos denominados de actinorrizas (10). Cerca de 200 espécies de plantas não leguminosas, distribuídas em 20 gêneros e 8 ordens, podem ser noduladas por *Frankia* (Quadro 5).

O termo actinomiceto identifica microrganismos classificados como bactérias, apesar de apresentarem similaridades com fungos, pois produzem filamentos finos e ramificados de micélio no solo (3;33).

Quadro 5. Plantas formadoras de nódulos do tipo encontrado em *Alnus*

| Família | Gênero |
|---------------|--|
| Betulaceae | <i>Alnus</i> Mill. |
| Casuarinaceae | <i>Casuarina</i> Adans. |
| Coriariaceae | <i>Coriaria</i> Hook. |
| Datisceae | <i>Datisca</i> L. |
| Elaeagnaceae | <i>Elaeagnus</i> L. <i>Hippophae</i> L. <i>Shepherdia</i> Nutt. |
| Myricaceae | <i>Myrica</i> L. |
| Rhamnaceae | <i>Ceanothus</i> L. <i>Colletia</i> Comm. <i>Discaria</i> Hook. |
| | <i>Kentrothamnus</i> Suss. & Overkott <i>Talgueena</i> Miers <i>Trevoa</i> Miers ex Hook. |
| Rosaceae | <i>Dryas</i> L. <i>Cercocarpus</i> Kunth <i>Chamaebatia</i> Benth. <i>Cowania</i> D. Don <i>Purshia</i> DC. <i>Rubus</i> L. |

Referência: Bond (10).

FORMAÇÃO DO NÓDULO POR FRANKIA EM ESPÉCIES ARBÓREAS

O nódulo de plantas actinorrízicas é uma estrutura perene formada por repetidas ramificações das raízes laterais e que termina em um nódulo lobular. Os nódulos podem ser classificados em dois principais grupos morfológicos: os nódulos encontrados em *Alnus* (Figura 3a) e os encontrados em *Casuarina*/*Myrica* (Figura 3b).

O sistema de estabelecimento da simbiose segue o mesmo processo inicial de infecção observado para o rizóbio em leguminosas arbóreas. Entretanto, o processo de formação apresenta maior complexidade, visto que requer uma sucessão de etapas para o estabelecimento do endófito (actinomiceto), na rizosfera. As principais características morfológicas da estrutura interna dos nódulos de *Frankia* e *Rhizobium* podem ser comparadas observando-se a Figura 4 e maiores detalhes são descritos no Quadro 6.

Os estudos sobre a formação de nódulos por actinomicetos foram desenvolvidos, principalmente, em *Alnus* sp. Na fase inicial da infecção, forma-se um nódulo primário que será a base do nódulo verdadeiro. A infecção primária ocorre quando da entrada do microrganismo dentro do pêlo radicular e com o

desenvolvimento intercelular de uma fina hifa do actinomiceto; o processo continua com as células do córtex da raiz sofrendo divisões celulares, antes de serem infectadas pela hifa. Com a maioria das células do córtex infectadas, forma-se um ramalhete de hifas com vesículas nas extremidades. O nódulo verdadeiro é completado pelo surgimento da raiz lateral, cujo processo promove o fechamento dos espaços do nódulo primário e este assume a forma lobular, causada pela persistente infecção da região cortical (11). O desenvolvimento apical e morfológico do nódulo lobular cria zonas específicas para o endófito. Partindo do ápice para a base do nódulo, o actinomiceto fica localizado logo após a região meristemática até uma certa extensão, além da qual desaparece (Figura 4a). Esta descrição foi feita para nódulos encontrados em *Alnus* e não deve ser considerada como a principal, pois existem diferenças entre a forma e a estrutura das vesículas entre as espécies actinorrízicas (11,39).

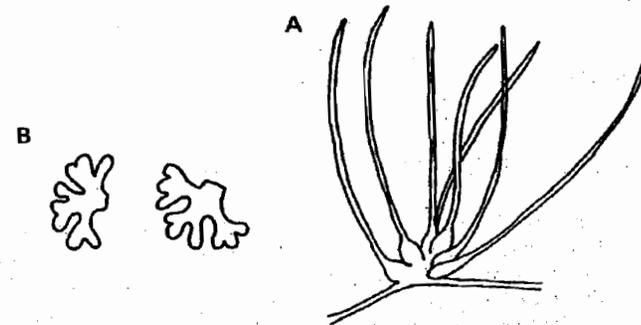


Figura 3. Tipo de nódulos em raízes de plantas não leguminosas: (A) tipo *Alnus* e (B) tipo *Casuarina*/*Myrica*. Fonte: Becking (5).

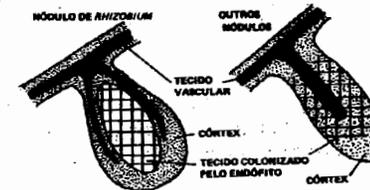


Figura 4. Corte longitudinal de nódulos de *Rhizobium* e de *Frankia* mostrando a distribuição interna dos tecidos colonizados. Fonte: Mosse (33).

Quadro 6. Comparação do processo de nodulação entre leguminosas e não leguminosas

| Características | Leguminosas | Não leguminosas |
|--|---|--|
| Endófito | <i>Rhizobium</i> | <i>Frankia</i> |
| Reação à presença do endófito | enrolamento e ramificação do pêlo radicular | idem |
| Método de invasão | via pêlos radiculares e epiderme (raro) | via pêlo radicular |
| Sítio de infecção do nódulo | córtex da raiz | um nódulo primário a partir do córtex e nódulo fixador a partir do periciclo |
| Localização do tecido vascular do nódulo | cortical | central |
| Localização do tecido infectado | central | cortical |
| Estrutura de fixação de nitrogênio | bacteróide | vesícula do endófito |
| Pigmentação | hemoglobina | antocianinas/tanino |
| Longevidade | de poucas semanas a perene | perene |

Referência: Sprent (37).

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR FRANKIA

As vesículas parecem ter uma significância funcional muito importante, quanto à atividade da nitrogenase. A fixação, *in vitro*, ocorre quando vesículas são produzidas pelos micélios de *Frankia*, em cultura líquida com baixos teores de oxigênio dissolvido, parecendo ser importante para a simbiose a presença de estruturas ou adaptações metabólicas, dentro do hospedeiro, que restrinjam a difusão do oxigênio no sítio de fixação (9). Por outro lado, certas estirpes de *Frankia* em *Casuarina* podem fixar nitrogênio sem formar vesículas em meio de cultura e dentro dos nódulos (15). Apesar de a necessidade de vesículas para a fixação do nitrogênio ser controversa, estudos de Becking (6) demonstraram que a porção intermediária do nódulo contém mais vesículas ativas e, justamente nesta região ocorre a fixação ativa do nitrogênio, confirmando a importância vital dessas estruturas. A técnica conduzida para a determinação da capacidade fixadora de *Frankia* é idêntica à empregada no sistema leguminosa-rizóbio. A redução do acetileno e o cultivo em solução nutritiva, sem nitrogênio combinado, são as principais técnicas utilizadas para detectar e/ou avaliar a extensão do fenômeno, em laboratório. A avaliação de campo da fixação pode ser estimada pela técnica do isótopo ^{15}N . Valores obtidos por este método podem ser observados no quadro 7.

A presença de micorrizas em raízes de árvores auxilia no processo de fixação biológica do nitrogênio. Rose & Youngberg (37), estudando os efeitos da

Quadro 7. Fixação anual de nitrogênio por plantas não leguminosas associadas com *Frankia*, em condições de campo

| Hospedeiro | Nitrogênio fixado kg ha ⁻¹ ano ⁻¹ |
|------------------------------------|--|
| Árvores | |
| <i>Alnus crispa</i> | 61 |
| <i>A. glutinosa</i> | 56 |
| <i>A. incana</i> | 40 |
| <i>A. rubra</i> | > 300 |
| <i>A. rugosa</i> | 193 |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | 229 |
| <i>Myrica cerifera</i> | 3 |
| <i>M. rubra</i> | 15-25 |
| Plantas herbáceo-arbustivas | |
| <i>Ceanothus</i> spp. | 60 |
| <i>Dryas drumondii</i> | 18-36 |
| <i>Hippophae rhamnoides</i> | 179 |

Referência: Becking (4).

endomycorriza e actinomicetos filamentosos em associação com *Ceanothus velutinus*, verificaram que o suprimento de N e P foi suficiente ao crescimento da planta, em consequência do estabelecimento simultâneo dos microssimbiontes. O nível de cálcio na planta aumentou, bem como a produção de biomassa seca. A nodulação e a atividade da nitrogenase também tiveram aumentos significativos.

APLICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES DE NÃO LEGUMINOSAS-FRANKIA

O impacto econômico do uso de plantas não leguminosas noduladoras com *Frankia* é maior na Silvicultura do que para culturas agrícolas. Árvores como *Alnus* e *Casuarina* fornecem madeira para muitos países (20), sendo que *Alnus* é largamente utilizado para colonizar solos alterados e com resíduos urbanos incorporados e em consorcio com essências florestais não fixadoras como *Fraxinus*, *Liquidambar*, *Liriodendron*, *Pinus*, *Platanus*, *Populus* e *Pseudotsuga*. Além da simbiose, *Alnus* também fornece e libera compostos orgânicos para o solo, que podem estimular o crescimento de microrganismos fixadores de vida livre (38). Plantas herbáceo-arbustivas associadas com *Frankia* como, por exemplo, *Ceanothus*, podem ser empregadas para enriquecimento de solos florestais com deficiência de nitrogênio, principalmente em consorcio (10). A produção de madeira, para serraria e energia, e de biomassa, o controle da erosão e a

revegetação de áreas semi-áridas, áridas e desérticas são outras aplicações das árvores actinorrhizas. O potencial destas plantas pode ser visualizado no quadro 8.

Quadro 8. Potencial de aplicação de árvores hospedeiras de *Frankia*

| Família | Gênero estudado | Sítio ecológico indicado |
|---------------|------------------|--|
| Betulaceae | <i>Alnus</i> | Plantio em solos pobres, solos com resíduos industriais e de mineração |
| Casuarinaceae | <i>Casuarina</i> | Florestas tropicais, solos salinos, áreas desérticas e fixação de dunas de areia |
| Myricaceae | <i>Myrica</i> | Plantio em áreas inundáveis, fixação de dunas de areia, recuperação de áreas com solos alterados e com resíduos de mineração |

Referência: Berry (9).

ASSOCIAÇÃO ESPECIAL: NÓDULOS EM FOLHAS

Nódulos foliares têm sido descritos em espécies de plantas arbustivas e lenhosas, tendo sido detectados na Ásia. Representantes destas plantas pertencem aos gêneros *Ardisia* (família Myrsinaceae), *Pavetta* e *Psychotria* (família Rubiaceae) (41). Estudos desenvolvidos com *Ardisia crispa* e *Psychotria punctata* demonstram a existência da simbiose entre este grupo de plantas e uma bactéria de taxonomia indefinida. A bactéria é mantida sobre a planta, por secreções da brotação e da parte aérea da planta, sendo essas secreções constituídas por uma mucilagem composta de carboidratos e proteínas (31). Posteriormente, a bactéria invade a câmara subestomática dos poros estomáticos, presentes na superfície das folhas e receptáculos florais. Com o desenvolvimento e a proliferação da camada da epiderme, ao redor do poro, as bactérias são empurradas para o interior da lâmina foliar e encapsuladas, formando um pequeno nódulo interno. O crescimento da colônia bacteriana e do tecido do nódulo causam a expansão do mesmo, originando, por sua vez, uma rede de células interconectadas, dentro da qual ocorrem as trocas metabólicas entre o microssimbionte e a planta hospedeira (32). A modificação na estrutura dos simbiotes, após o estabelecimento da relação simbiótica, é encontrada tal como em outras simbioses entre bactérias e plantas. A bactéria apresenta pleomorfismo, enquanto que as células do mesófilo foliar perdem o cloroplasto, que é substituído por plastídeos degenerados, armazenadores de lipídeos (27). O valor e a importância desse tipo de associação são contraditórios. Evidências apresentadas por Edwards & Lamotte (19) mostram que o valor do nódulo estaria relacionado com a produção de hormônios, da classe das citocininas. Van Hove (40) pesquisou a possibilidade da fixação por nódulos foliares e concluiu que a quantidade fixada é muito baixa e pouco significaria para

a economia do nitrogênio, para a planta e para o ecossistema. Por outro lado, todos os trabalhos mais recentes são unânimes em aceitar a simbiose, sem, no entanto, identificar taxonomicamente a bactéria e, principalmente, quantificar a fixação biológica do nitrogênio (30).

LITERATURA CITADA

1. AKKERMANS, A.D.L. & HOWERS, A. Morphology of nitrogen fixers in forest ecosystems. In: GORDON, J.C. & C.T. WHEELER eds. Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1983. p.7-54.
2. ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. The leguminosae-A source book of characteristics, uses, and nodulation. Wisconsin, The University of Wisconsin Press, 1981, 812p.
3. ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1977. 463p.
4. BECKING, J.H. Global impacts of applied microbiology. GIAM IV. Fourth International Conference. São Paulo, 1973. 40p.
5. BECKING, J.A. Root nodules in non-legumes. In: TORREY, J.C. & CLARKSON, D.T. ed. The development and functions of root. Londres, Academic Press, 1974. p.507-566
6. BECKING, J.H. Endophyte and association establishment in non-leguminous nitrogen-fixing plants. In: Recent developments in nitrogen fixation. New York, Academic Press, 1977. p.551-568.
7. BECKING, J.H. Root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and *Parasponia* (Ulmaceae). Pl. and Soil, Hague, 51(2):289-296, 1979.
8. BECKING, J.H. N₂-fixing tropical non-legumes. In: DOMMERGUES, Y.R. & DIEHM, H.G. eds. Microbiology of tropical soils and plant productivity. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1982. p.109-146.
9. BERRY, A.M. Cellular aspects of root nodule establishment in *Frankia* symbiosis. In: KOSUGE, T. & NESTER, E.W. eds. Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives. New York, Macmillan Publishing Company, V.2., 1987. p.194-213.
10. BOND, G. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems. In: GORDON, J.C. & WHEELER, C.T. eds. Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1983. p.55-106.
11. BROUGHTON, W.J. Nitrogen fixation: ecology. Oxford, Clarendon Press, 1981. 289p.
12. CAMPELLO, A.B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1976. 132p. (Tese de Mestrado)

13. CARDOSO, E.J.B.N. Interação micorrizas-microrganismos não patogênicos. In: Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 1., Anais. Lavras, Edições FAEPE, 1986. p.60-75.
14. CHIARANDA, R.; POGGIANI, F. & SIMÕES, J.W. Crescimento das árvores e deposição de folheto em talhões florestais plantados em solos alterados pela mineração do xisto. Piracicaba, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1983. p.25-28. v.25.
15. DIXON, R.O.D. & WHEELER, C.T. Biochemical, physiological and environmental aspects of symbiotic nitrogen fixation. In: GORDON, J.C. & WHEELER, C.T. eds. Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1983. p.107-171.
16. DÖBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. Pesq. Agrop. Bras. Brasília, 19(s/n):83-90, 1984.
17. DREYFUSS, B.L.; ALAZARD, D. & DOMMERGUES, Y.R. New and unusual microorganisms and niches. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A. eds. Current perspectives in microbial ecology. Washington, American Society of Microbiology, 1984. p.161-169.
18. DREYFUSS, B.L.; RINAUDO, G. & DOMMERGUES, Y.R. Observations on the use of *Sesbania rostrata* as green manure in paddy fields. J. Appl. Microbiol. Biotech, Oxford, 1(2):111-121, 1985.
19. EDWARDS, W. & LAMOTTE, C.E. Evidence for cytokinin in bacterial leaf nodules of *Psychotria punctata*, Rubiaceae. Pl. Physiol., Bethesda, 56(3):425-428, 1975.
20. EUA - National Academy of Sciences. Microbial Process: Promising Technologies for Developing Countries. Washington, 1979. 195p.
21. EUA - National Academy of Sciences. Tropical Legumes: Resources for the Future. Washington, 1979. 331p.
22. EUA - National Academy of Sciences. Firewood Crops. Shrub and tree species for energy production. Washington, 1980. 237p.
23. FARIA, S.M.; MOREIRA, V.C. & FRANCO, A.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. para espécies de leguminosas florestais. In: Simpósio sobre Fixação de N₂ em Árvores Tropicais. Anais. Rio de Janeiro, EMBRAPA-PNPBS/UFRJ, 1983.
24. FARIA, S.M.; SUTHERLAND, J.M. & SPRENT, J.I. A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp. (Leguminosae). Pl. Sci., Limerick, 45:143-147, 1986.
25. FRANCO, A.A. & SILVA, G.G. Potential of the *Rhizobium* symbiosis in tree legumes. In: Proceedings of the Workshop on *Rhizobium*/Legume Inoculants. Porto Alegre, UNEP/UNESCO/FAO/IPAGRO/UFRGS., 1985. p.111-129.
26. GALVÃO, A.P.M. Árvores fixadoras de nitrogênio no Programa Nacional de Pesquisa Florestal. Pesq. Agropec. bras. Brasília, 19(s/n):13-20, 1984.

27. GARDNER, I.C.; MILLER, I.M. & SCOTT, A. The fine structure of the leaf nodules of *Ardisia crispa*, Myrsinaceae. Botanical Journal of the Linnean Society, London, 83(2):93-102, 1981.
28. MAGALHÃES, F.M.M.; MAGALHÃES, L.M.S.; OLIVEIRA, L.A. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus. Acta Amaz., Manaus, 12(3):509-514, 1982.
29. MENDES FILHO, J.M.A.; POGGIANI, F. & LAPA, R.A. Comportamento de três espécies em solo alterado pela exploração do xisto na região de São Mateus do Sul-PR. In: Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais, 4. Bracatinga, uma alternativa para reflorestamento. 1981. p.149-160, 1981. (Documentos URPFCS,5)
30. MILLER, I.M. & DONNELLY, A.E. Location and distribution of symbiotic bacteria during floral development in *Ardisia crispa*. Pl. Cell Environ., Oxford, 10(9):715-724, 1987.
31. MILLER, I.M.; SCOTT, A. & GARDNER, I.C. The development, structure and function of dendroid collectors in *Psychotria kirkii*, Rubiaceae. Ann. Bot. London, 51(5):621-630, 1983.
32. MILLER, I.M.; SCOTT, A. & GARDNER, I.C. Leaf nodule development in *Psychotria kirkii*, Rubiaceae. Ann. Bot. London, 52(6):791-802, 1983.
33. MOSSE, B. A microbiologist's view of root anatomy. In: WALKER, N. ed Soil Microbiology, A critical review. London, Ed. Butterworth, 1975. p.39-66.
34. PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, MacGraw Hill do Brasil, 1980. 563p. v.1.
35. RIBEIRO JUNIOR, W.Q. Eficiência e competitividade de estirpes de *Rhizobium* sp. para *Albizia lebbek* (L.) Benth. e *Enterolobium contortisiliquum* (VELLOSO) Morang. em latossolo ácido. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1985. 106p. (Tese de Mestrado).
36. RINAUDO, G.; DREYFUSS, B. & DOMMERGUES, Y.R. *Sesbania rostrata* as a green manure for rice in West Africa. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. eds. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Cali, CIAT. 1982. p.441-445.
37. ROSE, S.L. & YOUNGBERG, C.T. Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation and nitrogen fixation. Can. J. Bot., Ottawa, 59(1):34-39, 1981.
38. SPRENT, J.I. The Biology of nitrogen-fixing organisms. London, MacGraw-Hill Book Company Limited, 1979. 196p.
39. TORREY, J.G. Nitrogen fixation by actinomycete-noduled angiosperms. Bioscience, Washington, 28(9):586-592, 1978.

40. Van HOVE, C. Bacterial leaf symbiosis and nitrogen fixation. In: NUTMAN, P.S. ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge, Cambridge University Press. 1976. p.539-550.
41. VASCONCELOS, J.I.P. Fixação biológica do nitrogênio em plantas de interesse econômico do Nordeste. CNPq/FCPC/UFC. Relatório Técnico Anual. 1980.

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO COM GRAMÍNEAS

Johanna Döbereiner⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas agrícolas que contribuem para a reciclagem do N perdido para a atmosfera, os mais importantes são as simbioses das leguminosas, discutidas nos capítulos 9 e 11. Entretanto, outras associações menos perfeitas, como as com cereais e gramíneas, estão rapidamente ganhando em importância, já que os cereais representam a base alimentar mais importante, especialmente em países em desenvolvimento. Entre os cereais e gramíneas em nosso meio, todos, com exceção do arroz e do trigo, possuem uma via fotossintética (via C4) mais eficiente que leguminosas e gramíneas temperadas, e, com isso, são capazes de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores. Esse tipo de planta pode mais facilmente dispensar fontes energéticas para a alimentação de bactérias diazotróficas e o processo energeticamente caro da conversão do N₂ atmosférico em formas combinadas utilizáveis pelas plantas.

A identificação de uma associação entre plantas e bactérias fixadoras de N₂ depende da demonstração de interações bactéria-plantas em benefício de pelo menos um dos participantes. Várias associações deste tipo foram identificadas, a maioria delas em regiões de clima tropical ou subtropical, onde as temperaturas do solo, durante todo o ano, são mais favoráveis aos processos microbiológicos em geral.

(1) EMBRAPA/CNPBS, km 47 da antiga rodovia Rio - São Paulo, CEP 23851 Seropédica, RJ.

BACTÉRIAS AERÓBIAS

As primeiras associações com bactérias diazotróficas identificadas foram as de bactérias aeróbias com a cana-de-açúcar e com a grama "batatais" (*Paspalum notatum* cv batatais). Bactérias do gênero *Beijerinckia*, que ocorrem quase exclusivamente em regiões tropicais (5), foram isoladas de 95% de solos de canaviais, ao passo que apenas 62% de amostras de solos coletados sob outra vegetação continham a bactéria, conforme demonstrou Döbereiner (10, 11). Nesses mesmos trabalhos observou-se, ainda, que *Beijerinckia* spp se multiplicam seletivamente na superfície das raízes da cana-de-açúcar, em detrimento de outras bactérias, fungos e actinomicetos. Uma nova espécie de *Azotobacter*, *A. paspali*, foi encontrada em números elevados quase exclusivamente nas raízes da "grama batatais". Ela foi encontrada em 98% de 252 amostras de raízes desta grama, enquanto apenas 3% das amostras de outros ecotipos da mesma espécie e nenhuma das 200 amostras de outras plantas continham a bactéria (12, 13).

Dentre todas as associações, até hoje conhecidas, de bactérias fixadoras de N₂ com plantas, essa descrita acima é a mais específica, inclusive em relação à simbiose das leguminosas. Infelizmente, o mecanismo dessa associação até hoje ainda não foi esclarecido.

BACTÉRIAS MICROAERÓFILAS

Os rápidos avanços no descobrimento de outras associações nos últimos anos deve-se principalmente à introdução de meios sem N e semi-sólidos para o isolamento das bactérias associadas. Nesses meios, foi isolada uma série de bactérias novas que têm a característica comum de, apesar de serem aeróbias quando cultivadas em meio de cultura contendo N mineral, apenas conseguirem fixar o N₂ e crescer com N₂ como única fonte de N em condições microaerófilas, isto é, onde há O₂ suficiente para a sua respiração, sem, no entanto, haver acúmulo de O₂ no meio que inativa a nitrogenase.

Em meios semi-sólidos essas bactérias se movem ativamente, atraídas por um mecanismo de quimotaxia para aquela região dentro do meio onde a taxa da difusão do O₂ está em equilíbrio com a taxa da respiração da bactéria. Com esses meios semi-sólidos, nos últimos 10 anos foram descobertas 8 novas bactérias fixadoras de N₂ que têm a capacidade de se associarem com gramíneas, cereais ou com a cana-de-açúcar.

Azospirillum spp. - Ocorrem em números elevados na maioria dos solos tropicais, em raízes de gramíneas forrageiras, milho, sorgo, arroz e trigo, além de várias outras culturas e foram encontrados no Brasil, México, Argentina, Colômbia, Senegal, Índia, Paquistão e Austrália, como ainda, em números meno-

res, em vários países de clima temperado (15). Foram descritas 4 espécies, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* (18,23), *A. amazonense* e, recentemente, *A. halopraeferans* (21). Todas estas espécies ocorrem em números muito mais elevados na rizosfera de gramíneas e cereais do que no solo e foram isoladas também de raízes esterilizadas. *A. halopraeferans*, por enquanto, somente foi isolada de uma espécie de capim comum em solos salinos do Paquistão (*Kallar grass*), e tentativas de encontrá-lo em outras espécies de regiões áridas no Brasil ficaram sem sucesso.

Além do enriquecimento de *Azospirillum* spp. na rizosfera, o papel destas bactérias na fixação de N₂ associadas à *Digitaria decumbens* e ao milho foi demonstrado pela correlação altamente significativa entre a atividade da nitrogenase (medida pela redução de acetileno) de pedaços pequenos (1 cm) de raízes com a de culturas de enriquecimento de *Azospirillum* obtidas com estes mesmos pedaços de raízes (8,14).

Recentemente, foram ainda encontradas três novas bactérias fixadoras de N₂, as quais se multiplicam seletivamente nas raízes de milho, sorgo, trigo ou cana-de-açúcar e que conseguem infectar as raízes: *Herbaspirillum seropedicae* (2), *Bacillus azotofixans* (22) e *Acetobacter diazotrophicus* (9, 16). Esta última parece especificamente adaptada à associação com a cana-de-açúcar, já que cresce melhor com altas concentrações de açúcar no meio (10%), e até hoje não foi encontrada em associação com outras plantas. Assemelhando-se às bactérias produtoras de ácido acético, esta é uma bactéria da família *Acetobacteriaceae* e oxida etanol formando ácido acético que continua sendo oxidado até H₂O e CO₂. Da mesma forma, a glucose é completamente oxidada após formação de ácidos e a bactéria continua fixando N₂ e crescendo em meio com pH abaixo de 3.0. No quadro 1 podem-se comparar as principais características das bactérias fixadoras de N₂ que se associam às plantas superiores.

SIGNIFICÂNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO COM GRAMÍNEAS

Na maioria das associações acima, mesmo quando confirmado o efeito positivo da planta sobre o desenvolvimento das bactérias, ainda não há confirmação de efeitos benéficos da bactéria sobre a planta. Em Israel, onde os solos estão quase estéreis, a inoculação com *Azospirillum* tem proporcionado aumentos de produção de cereais na ordem de 10 a 30% (20), mas este mesmo inoculante não surtiu efeito no Brasil. É que *Azospirillum* ocorre em abundância em solos brasileiros, e somente se pode esperar um efeito da inoculação, sob condições de campo, em locais em que forem introduzidas bactérias mais eficientes do que as já existentes no solo, e, quando estas se estabelecerem nas raízes das plantas inoculadas. Isto foi possível com certas estirpes de *A. brasilense* selecio-

Quadro 1. Comparação de bactérias fixadoras de N₂ que se associam com plantas [Döbereiner (12); Tarrand et al. (23); Seldin et al. (22); Baldani et al. (2); Cavalcante & Döbereiner (9, 16) e Reinhold et al. (21)]

| | <i>Azotobacter paspalii</i> | <i>Beijerinckia indica</i> , <i>B. fluminensis</i> | <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>A. lipoferum</i> | <i>A. amazonense</i> | <i>A. halopraeferans</i> | <i>Herbaspirillum seropedicaceae</i> | <i>Acetobacter diazotrophicus</i> | <i>Bacillus azotofixans</i> |
|---|-----------------------------|--|--|----------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Crescimento sob ar | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fixação N ₂ sob ar | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Crescimento com N ₂ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fixação de N ₂ com 10 mM NO ₃ | + | ± | - | - | - | - | + | + |
| Uso de sacarose | + | + | - | + | - | - | + | ± |
| pH ótimo | 7,0-8,0 | 5,0-8,0 | 6,0-7,0 | 5,8-6,6 | 6,8-8,0 | 5,3-8,0 | 3,8-5,5 | 6,5-7,5 |
| Temperatura (C) ótima | 37 | 30 | 35 | 35 | 41 | 35 | 30 | 32 |
| Isolado de raízes esterilizadas | - | - | - | + | - | + | + | + |

Quadro 2. Efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* em experimentos de campo no Paraná no estabelecimento da bactéria e na incorporação de N pela planta (Baldani et al. (3), Baldani et al. (4))

| Inoculante | Bactéria inoculada | | N total na planta | |
|-------------------------------|--------------------|-----------|-----------------------|--------|
| | Solo rizosf. | Raiz est. | 15kg N ⁽¹⁾ | 60kg N |
| | % | | kg ha ⁻¹ | |
| Experimento I | | | | |
| Controle | 1 | 5 | 57 | 69 |
| Sp7 (Cd) ⁽²⁾ turfa | 61 | 11 | 56 | 66 |
| Sp 245 ⁽³⁾ turfa | 44 | 76 | 69 | 68 |
| Experimento II | | | | |
| Controle | 0 | 0 | 24 | 30 |
| Sp 245 turfa | 28 | 89 | 33 | ... |
| Sp 245 óleo | 0 | 0 | 26 | ... |

(1) Adubação nitrogenada aplicada nas plantas de trigo e sorgo.

(2) Estirpe isolada de solo abaixo de *Digitaria*, multiplicada e veiculada em turfa.

(3) Estirpe isolada de raízes esterilizadas de trigo no Paraná, multiplicada e veiculada em turfa ou óleo.

nadas e marcadas com resistência a antibióticos, em trigo e sorgo (3). No quadro 2 pode-se observar que somente estas estirpes proporcionam efeitos sobre o crescimento das plantas.

Era de se esperar que os efeitos da inoculação com *Azospirillum* na incorporação de N total da planta fossem devidos à fixação de N₂ pela bactéria. Entretanto, observou-se que o efeito da inoculação foi principalmente devido à assimilação mais eficiente do ¹⁵N do solo e não devido à fixação de N₂ atmosférico (6), quando trigo, inoculado ou não, foi plantado em solo contendo concentrações conhecidas do isótopo pesado de ¹⁵N, onde uma fixação de N₂ se manifestaria através da diluição isotópica com o ¹⁴N da atmosfera (método de diluição isotópica). Isto ainda foi observado em experimentos com mutantes de *Azospirillum* nitrato redutase negativas que não tiveram o mesmo efeito, confirmando, dessa forma, o papel da nitrato redutase da bactéria na assimilação de nitrato pela planta.

Mesmo que ainda não se saiba quais das bactérias diazotróficas fixam quantidades substanciais de N₂ em associação com as plantas do campo, há provas claras de que quantidades economicamente importantes estão sendo fixadas sob condições de campo, sem nenhuma inoculação. Os dados mais confiáveis são de experimentos usando o método de diluição isotópica de ¹⁵N e balanços do N total no sistema (19). Determinações de N no solo e nas plantas, durante 17

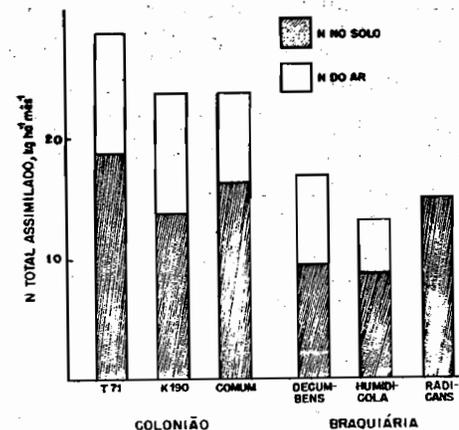


Figura 1. Fixação de N em variedades de capim-colônias e espécies de braquiária (7 e 20). N total na planta proveniente do solo e do ar através da fixação biológica de N₂ por bactérias naturalmente existentes no solo. Valores médios dos meses janeiro a abril.

e 24 anos de cultivo consecutivo de arroz irrigado nas Filipinas, mostraram que 103 e 79 kg N/ha.ano foram acrescentados pela fixação biológica em duas localidades respectivamente (1).

Resultados da avaliação da fixação de N₂ pelo método de diluição isotópica com várias gramíneas forrageiras no Brasil são resumidos na figura 1. Os resultados mais promissores foram obtidos com cana-de-açúcar que, dependendo da cultivar, pode obter até 60% de seu nitrogênio através da fixação biológica (17). Esses resultados mostram que, além de estudos das bactérias fixadoras de N₂ e do mecanismo de sua associação com plantas, é muito importante a seleção e o melhoramento de gramíneas, cereais e da cana-de-açúcar, observando-se a capacidade de sustentar a fixação de nitrogênio, além das características agrônômicas.

LITERATURA CITADA

- APP, A.; SANTIAGO, T.; MENGUIITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I.; DE D'ATTA, S.K. & ROGER, P. Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the contribution of phototrophic nitrogen fixation. *Field Crops Res.*, Amsterdam, 9:17-27, 1984.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÓBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 36:86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I. & DÓBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Pl. Soil*, Hague, 90:35-45, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; MANDEL, J.; ROCHA, & DÓBEREINER, J. Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum brasilense* inoculants in peat and oil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 4., Rio de Janeiro, EMBRAPA, 1987. (poster)
- BECKING, J.H. Studies on N fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical and ecological distribution in soils. *Pl. Soil*, Hague, 14:49-82, 1961.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÓBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. *Pl. Soil*, Hague, 95:109-121, 1986.
- BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. *Pl. Soil*, Hague, 90:265-292, 1986.
- BULOW, J.F.W. von & DÓBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Washington, 72(6):2389-2393, 1975.
- CAVALCANTE, V.A. & DÓBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Pl. Soil*, Hague, 108:23-31, 1988.
- DÓBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *R. bras. Biol.*, Rio de Janeiro, 19:251-258, 1959.
- DÓBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Pl. Soil*, Hague, 15:211-216, 1961.
- DÓBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. Agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 1:357-365, 1966.
- DÓBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentbl. Bakt. Parasitke*, 124:224-230, 1970.
- DÓBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. eds., *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman, Washington State University Press, p.518-538. v.II., 1976.
- DÓBEREINER, J.; MARRIEL, I.E. & NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 22:1464-1473, 1976.
- GILLES, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, E.; JANSSENS D. D.; KROPPENSJEDT, R.N.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÓBEREINER, J. & DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. - a nitrogen fixing acidic acetic acid bacterium associated with sugar cane. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 39:361-364, 1989.
- LIMA, E.; BODDEY, R.M. & DÓBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using on ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 19:165-170, 1987.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÓBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, Rio de Janeiro, 55:417-430, 1983.
- MIRANDA, C.H.B. & BODDEY, R.M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in ¹⁵N labelled soil. *Agron. J.*, Madison, 79:558-563, 1987.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, 3:223-228, 1985.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERTSERS, K.; THIELEMANS, D. & DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L. Kuth)). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 37:43-51, 1987.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. & PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov. a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 34:451-456, 1984.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÓBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 24:967-980, 1978.

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO POR MICRORGANISMOS ASSIMBIÓTICOS

Alaides P. Ruschel⁽¹⁾ & Marisia C.F. Pontes⁽²⁾

BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE

INTRODUÇÃO

Os microrganismos que fixam N₂ assimbioticamente (de vida livre) são de excepcional importância ecológica, uma vez que se constituem nos primeiros colonizadores das rochas e cinzas vulcânicas, influenciando na intemperização das rochas e na manutenção do nitrogênio do solo em ecossistemas naturais.

MICRORGANISMOS ASSIMBIÓTICOS FIXADORES DE N

Os microrganismos assimbióticos fixadores de N estão distribuídos em duas grandes classes: quimiorganotróficos e fotolitotróficos (Quadro 1). O principal representante dos anaeróbios é o *Clostridium*, o primeiro microrganismo fixador de N, descoberto no século passado (1883) por Winogradsky. Metaboliza glicose a ácido butírico, CO₂ e H₂, o que originou seu nome, *C. butyricum*. Os Clostridia estão presentes em solos com matéria orgânica em decomposição e no rúmen de animais. Sob condições adversas formam endosporos.

⁽¹⁾ EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Caixa Postal 179, CEP 74000, Goiânia, GO.

⁽²⁾ Departamento de Biologia Vegetal - Universidade Federal de Viçosa. CEP 36570 Viçosa, MG.

Quadro 1. Microrganismos fixadores de N assimbióticos (gênero e exemplos de espécies), modificado de Postgate (47)

| Microrganismos | Gênero | Espécies (exemplos) |
|---|--|---|
| Quimiorganotróficos | | |
| Estritamente anaeróbios | <i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i> | <i>C. pasteurianum</i> <i>D. vulgaris</i> <i>D. ruminis</i> |
| Anaerób. facultativos (quando em aerobiose não fixam N) | <i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Propionibacterium</i> | <i>K. oxydoxa</i> <i>B. polymyxa</i> ; <i>B. macerans</i> ; <i>B. azotofixans</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>C. freundii</i> <i>E. intermedia</i> <i>P. shermanii</i> |
| Microaerofílicos | <i>Xanthobacter</i> <i>Azospirillum</i> <i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter</i> <i>Azotococcus</i> <i>Azomonas</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Derxia</i> | <i>X. flavum</i> ; <i>X. autotrophicum</i> <i>A. brasilensis</i> ; <i>A. amazonensis</i> <i>A. lipoferum</i> <i>A. peregrinum</i> <i>A. chroococcum</i> <i>A. vinelandii</i> <i>A. agilis</i> <i>A. macrocystogenes</i> <i>B. indica</i> ; <i>B. fluminensis</i> <i>D. gummosa</i> |
| Fotototróficos | <i>Herbaspirillum</i> <i>Acetobacter</i> | <i>H. seropedicae</i> <i>A. diazotrophus</i> |
| Anaeróbios | <i>Chromatium</i> <i>Chlorobium</i> <i>Ectothiospira</i> | <i>C. vinosum</i> <i>C. limicola</i> <i>E. shapovnikovii</i> |
| Anaerób. facultativo | <i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> | <i>R. rubrum</i> <i>R. palustris</i> |
| Microaerofílicos | <i>Plectonema</i> <i>Lyngbia</i> <i>Oscillatoria</i> | <i>P. boryanum</i> <i>L. aestuarii</i> |
| Aeróbios | <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> | |

Outros fixadores anaeróbios são redutores de sulfato, *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*, os quais têm pouca importância ecológica no solo, sendo muito encontrados em ambientes marinhos.

As bactérias anaeróbias facultativas somente fixam N₂ quando sob anaerobiose, embora se desenvolvam na presença de oxigênio. Vivem na água,

solo, e mesmo no rúmen de animais. Os principais representantes deste tipo são: *Klebsiella* e *Bacillus*, este último caracterizado pela formação de endosporos.

Certas bactérias fotolitotróficas são anaeróbias facultativas. Geralmente habitam nascentes de águas quentes sulfurosas ou águas poluídas.

As bactérias aeróbias são as mais comuns nos solos, sendo mais conhecidas as da família Azotobacteriaceae e que englobam *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azotococcus*, *Beijerinckia* e *Derxia* (57), similares em aparência e fisiologia e formam colônias gomosas e espalhadas em meio de cultura livre de nitrogênio.

As microaerofílicas tornaram-se muito conhecidas através de pesquisa feita no Brasil (13) e compreendem os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, comuns na rizosfera e interior de raízes de gramíneas. Geralmente fixam nitrogênio sob baixas tensões de oxigênio (pO₂=0,04%). Outras microaerofílicas utilizam energia de oxidação de íons de ferro e enxofre (*Thiobacillus*).

Os microrganismos fototróficos são também autotróficos, utilizando energia luminosa para fixar o CO₂. Podem ser anaeróbios estritos (*Chromatium* e *Chlorobium*), os quais utilizam enxofre elementar e tioculfatos, transformando-os em sulfatos. Podem ser verdes, vermelhos, ou purpúreos. Outros anaeróbios facultativos, *Rhodospirillum rubrum* e *Rhodopseudomonas palustris* não liberam oxigênio em seu processo fotossintético. Estas bactérias podem crescer heterotróficamente e sob presença de oxigênio no escuro, fixando N microaerofílicamente.

As características de alguns microrganismos assimbióticos fixadores de N encontrados no solo são apresentadas no quadro 2. Verifica-se que estes microrganismos têm metabolismo diferenciado, podendo-se concluir que quando não existem condições próprias para que um determinado microrganismo fixe nitrogênio, outro poderá estar em franca atividade, havendo assim um suprimento constante e moderado do elemento no ecossistema.

Quadro 2. Característica em meio de cultura de alguns microrganismos fixadores de N encontrados no solo

| Gênero | Forma célula | Esporos | Mobilidade | Coloração de Gram | O ₂ ambiental | Outros |
|--------------------|----------------------------------|---------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|---|
| <i>Azotobacter</i> | Bastonetes similares a leveduras | Cistos | + ou - flagelo peritríquico | - | aeróbio | Cresce melhor em meio deficiente de N |
| <i>Bacillus</i> | Bastonetes | + | + ou - flagelo peritríquico | + | anaeróbio facultativo | Metabolismo fermentativo. Geralmente proteolítico |
| <i>Clostridium</i> | Bastonetes | + | + flagelo peritríquico | + | anaeróbio | Metabolismo fermentativo. Muitas vezes proteolítico |

NÍVEL DE N₂-FIXADO

Torna-se difícil conhecer-se a magnitude da fixação biológica de N, promovida pelos microrganismos assimbióticos. Sob condições normais, a fixação pelos citados microrganismos é muito restrita (47), pois os mesmos requerem uma grande disponibilidade de material energético. Jensen (27) sugere que estimativas de 20 a 50 kg de N/ha são por demais elevadas, tendo em vista que os teores de matéria orgânica nos solos não são compatíveis para suportar este nível de fixação. Níveis anuais estimados em 7 kg de N/ha foram observados nos Estados Unidos, enquanto este valor decresce para 3 kg de N/ha em regiões semiáridas. *Azotobacter* e *Clostridium* fixam cerca de 0,5 kg de N/ha.ano (65).

Condições para que a fixação de N₂ se processe através dos microrganismos assimbióticos incluem: fonte de energia (substâncias orgânicas para os quimiorganotróficos), baixos níveis de N, nível adequado de nutrientes, pH em torno do neutro, e umidade adequada (40).

Os ganhos de N no solo através de fixadores assimbióticos são pequenos devido aos seguintes fatores:

a) os microrganismos quimiorganotróficos necessitam de carboidratos, sendo ineficientes em conversão, pois utilizam 1 g de carboidrato/1-10 mg de N fixado;

b) competem com outros microrganismos pela fonte de energia disponível, a qual normalmente é escassa;

c) a fixação de N é inibida em presença de N mineral.

Diante do exposto, certas práticas poderiam facilitar a fixação biológica de N, tais como, introdução de restos de cultura, revolvimento do solo e arejamento.

Algumas evidências mostram que a fixação assimbiótica pode contribuir para o enriquecimento do N no solo, como:

a) apreciável número de microrganismos fixadores presentes no solo;

b) possibilidade de se desenvolverem culturas sucessivas, no mesmo solo, sem adições de adubos (ex.: arroz alagado);

c) aumento do N no solo com o cultivo de gramíneas;

d) excreção de substâncias orgânicas pelas raízes.

SÍTIOS DE FIXAÇÃO

Em solo drenado

Torna-se difícil estabelecer quais seriam os sítios de fixação no solo, tendo em vista que os substratos para o crescimento de microrganismos estão

presentes no solo sob diferentes formas, e os microrganismos são estruturalmente adaptados a usá-los em muitas diferentes formas. Os microrganismos podem estar formando colônias ligadas ou não a diferentes substratos no solo (25). Brown et alii (7) demonstraram que *Azotobacter* pode caminhar na superfície da raiz mas movimenta-se muito pouco através do solo. Geralmente considera-se que os primeiros colonizadores são as cianobactérias diazotróficas, as quais não somente suprem o ambiente com matéria orgânica, mas também produzem substâncias metabólicas que podem solubilizar a rocha matriz (45, citado por 25).

Bactérias aeróbias são encontradas facilmente no solo. *Azotobacter*, de acordo com Brown et alii (7), varia de 20 - 8.000 células/g solo, podendo este número ser 3 vezes maior na rizosfera. Estas bactérias são dependentes de pH próximo da neutralidade ou ligeiramente alcalino. Em solo de reação ácida geralmente é encontrada a *Beijerinchia*.

Alexander e Wilson (3) calcularam que, em condições de campo, seriam necessários 500 kg de matéria orgânica para que *Azotobacter* (50.000 cél./dia) pudesse fixar 2-5 kg de N. Alexander (2), cita a necessidade de altas populações de fixadores de N no solo (10 células/g solo) para que haja um acúmulo de 2 kg de N/ha ao ano.

Em solos submersos

Em solos alagados, a camada superior mais aerada é local de fixação ativa por bactérias aeróbias mais que em camadas inferiores, ricas em celulose (37). Os produtos de decomposição de resíduos de plantas podem ser utilizados como fonte de energia pelos fixadores anaeróbios, das camadas inferiores do solo (48). O microrganismo responsável seria predominantemente o *Clostridium* (49), porém outros também podem ser de importância (*Desulfovibrio*, *Enterobacter*, etc.).

Embora a fixação por outras bactérias assimbióticas seja quase sempre inferior à fixação promovida por cianobactérias, as primeiras ocupam uma larga fração dos sítios alagados, e talvez a fixação por estes microrganismos seja significativa (28,73).

Outro sistema que contribui sobremaneira em regiões alagadas e a associação *Azolla-Anabaena*, onde a *Anabaena* (cianobactéria) pode fixar de 21-50 kg de N/ha mensalmente (55).

Evidências de acumulação de N em solos alagados, sob baixas tensões de oxigênio, podem não ser devidas somente aos aumentos através de fixação biológica, mas também às baixas perdas do elemento por lixiviação e desnitrificação (44).

EFEITO DA PLANTA

Estímulo da rizosfera de plantas não nodulantes sobre as bactérias fixadoras assimióticas tem sido muito citado (12). Associações foram descritas para *Paspalum notatum-Azotobacter paspali* (12), cana-de-açúcar (56, 57) e forrageiras (10), sendo também demonstradas para arroz (50, 77). Em alguns casos ocorrem associações mais estreitas entre planta e bactéria, que são tratadas no capítulo 12.

O efeito da planta pode ser observado por diferenças entre populações destas bactérias na rizosfera e nas entrelinhas em cana-de-açúcar (11) e arroz (4).

PESQUISAS FUTURAS

Deduz-se do exposto que os microrganismos assimióticos, fixadores de N não podem ser estudados separadamente, mas sim como componentes do sistema solo-planta. Apesar da sua contribuição ser duvidosa sob o ponto de vista agrônomico, seu papel no balanço de N do solo é de suma importância nos ecossistemas naturais, seja atuando na origem do solo, seja nas transformações dinâmicas ocorridas no solo normal.

CIANOACTÉRIAS

INTRODUÇÃO

Cianobactérias, cianofíceas ou algas verde-azuladas são vocábulos que distinguem um grupo de organismos até hoje muito discutido por botânicos, que os colocam junto ao grupo das algas e mais recentemente, por microbiologistas que os incluem entre as bactérias. Para os botânicos, a presença da clorofila e a liberação de O₂ a partir do processo fotossintético são aspectos que caracterizam fisiologicamente os fotoautotróficos aeróbios e são argumentos bastante fortes para incluir as cianobactérias junto ao grupo das algas eucarióticas. No entanto, para os microbiologistas, a organização da estrutura celular baseada na microscopia eletrônica e as análises bioquímicas da composição de parede celular e estrutura dos ribossomos que revelam a natureza procariótica de suas células, justificam a inclusão deste grupo junto às bactérias (5, 62, 63). Na oitava edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, em 1974, está contida, pela primeira vez a Divisão Cianobactéria dentro do Reino Procariota. A utilização dos termos algas verde-azuladas ou cianófitas deve ser desencorajada para não perpetuar a falsa impressão sobre a natureza biológica das cianobactérias (62).

Aceitar ou não uma posição taxonômica depende do ponto de vista de cada estudioso, mas, o importante é o conhecimento cada vez mais profundo sobre este grupo de organismos. Hoje, as cianobactérias desempenham um papel de destaque nos estudos relacionados com a fertilidade do solo, devido a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Estudos sobre sua ultra-estrutura, bioquímica e ecologia são extremamente importantes, pois conhecendo bem um organismo pode-se manejá-lo com mais eficiência no ambiente e conseqüentemente obtendo-se maior proveito de suas capacidades.

ORGANIZAÇÃO CELULAR

Uma das mais notáveis características das cianobactérias é a bainha de mucilagem que envolve mais externamente a célula. É provavelmente devido a essa camada que as cianobactérias resistem aos períodos de seca (31). Ela também está relacionada com os movimentos de deslizamentos que ocorrem em alguns organismos deste grupo (14). Pode-se apresentar reduzida, espessa, densa, diluída, lamelada e às vezes colorida. É um local onde se encontram inseridos, com muita frequência, outros organismos, tais como bactérias, algas verdes, diatomáceas, sendo este o maior motivo da dificuldade de se obter culturas axênicas. Sob microscopia eletrônica, a bainha se apresenta fibrilar (14, 23, 30, 31, 35, 68, 74). Sua constituição química não está muito bem definida. Tem sido confirmada a presença de hemicelulose em *Microcoleus vaginatus* (16), ácidos pécicos e mucopolissacarídeos (35, 68) e carboidratos, representados pela glicose, manose, galactose, xilose e fucose (15). Segundo Tuffery (68), a composição do meio de cultivo influencia na formação da bainha, como também com a idade das células o aspecto fibroso da bainha é perdido.

A parede celular de cianobactérias é complexa, apresentando-se multilamelada sob microscopia eletrônica (14, 30, 31).

A membrana plasmática ou plasmalema encontra-se situada mais internamente e possui permeabilidade seletiva, responsável pelo controle osmótico da célula. Em algumas cianobactérias, a plasmalema sofre invaginações formando estruturas membranosas no citoplasma (mesossomos) onde ocorrem processos metabólicos (1). A plasmalema de cianobactérias pode ser representada por um mosaico de sítios funcionais, alguns envolvidos na síntese da parede celular, outros na proliferação de tilacóides ou na respiração; contudo a manutenção da integridade celular e a permeabilidade diferencial seriam realizadas por toda a plasmalema (31). Segundo Wolk (75), pouco se sabe sobre as propriedades da plasmalema de cianobactérias.

O sistema fotossintético das cianobactérias é lamelar, e cada lamela é composta por duas membranas colapsadas lateralmente, onde estão localizados os pigmentos e enzimas relacionados com a fotossíntese. Em algumas

espécies, estes tilacóides se localizam periféricamente mas podem também se distribuir em toda a célula (34). A transferência da energia luminosa parece ocorrer na sequência: ficoeritrina - ficocianina -- aloficocianina- clorofila α (66).

O material nuclear das cianobactérias constituído do ácido desoxirribonucléico (DNA) pode ocorrer acumulado em uma única região ou em pequenos bastonetes. O ácido ribonucléico (RNA) está concentrado em partículas, os ribossomos, os quais aparecem em maior número na periferia da célula (24).

Além dos tilacóides, o material nuclear e os ribossomos ainda se encontram no protoplasma celular das cianobactérias; o vacúolo contém gás e inclusões citoplasmáticas tais como os grânulos de poliglicosídeos, cianoficina, polifosfatos, entre outros.

ESTRUTURAS ESPECIAIS

Acinetos

Os acinetos são células formadas por modificações das células vegetativas (Figura 1). A diferenciação do acineto é iniciada pelo crescimento da célula vegetativa acompanhada por deposições de camadas de carboidratos sobre a parede celular pré-existente, tornando-se mais espessa. No interior da célula há acúmulo de grânulos de cianoficina (reserva protéica) e permanência dos tilacóides (31). No acineto maduro há perda de ficocianina, a clorofila é substituída pela feofitina, o teor de beta-caroteno é diminuído e aumentado o de xantofilas. Devido a essas modificações do conteúdo de pigmentos, o acineto maduro adquire coloração amarelada. Em culturas, o início da esporulação coincide com o término da fase de crescimento exponencial (18). Fatores tais como, intensidade luminosa, temperatura, densidade de cultura, deficiência de fósforo e nitrogênio são controladores da esporulação (74).

A germinação do acineto inicia-se com a diminuição dos grânulos de cianoficina, a síntese de pigmentos, aparecimento de pequenos tilacóides vesiculares e aumento de grânulos de poliglicosídeos (31, 33). A divisão celular inicia-se normalmente quando o novo filamento ainda se encontra dentro dos envoltórios do acineto. Posteriormente há ruptura do envoltório, o que permite a liberação do novo filamento (23, 74).

Devido às modificações ocorridas na célula vegetativa para se diferenciar em acineto, este se torna particularmente resistente às condições adversas do meio, permanecendo viável por longos períodos (23).

Heterocistos

O heterocisto também é formado a partir da diferenciação de uma célula vegetativa (Figuras 1 e 2). Ocorre em cianobactérias pertencentes às

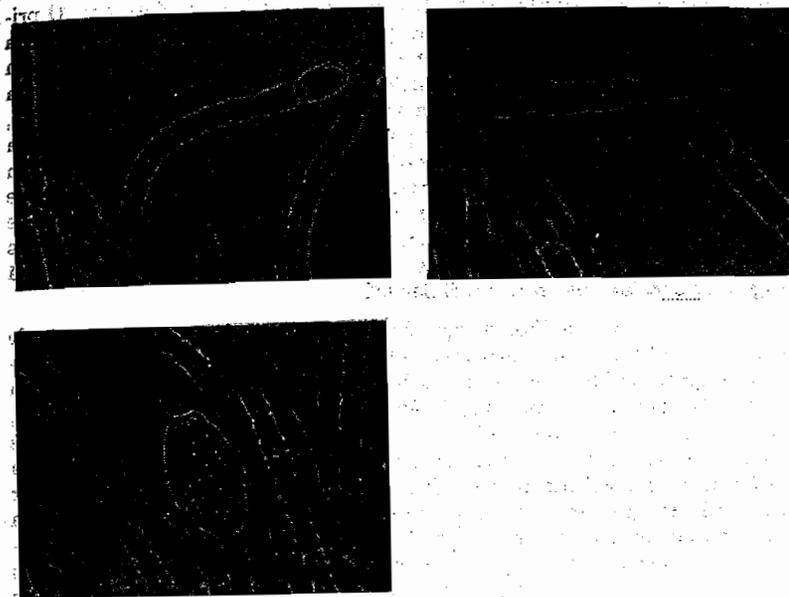


Figura 1. *Cylindrospermum minutissimum*. A: início da diferenciação do acineto. B: acineto em diferenciação. C: acineto maduro; h: heterocisto; v: célula vegetativa; as flechas indicam a diferenciação da célula vegetativa em acineto.

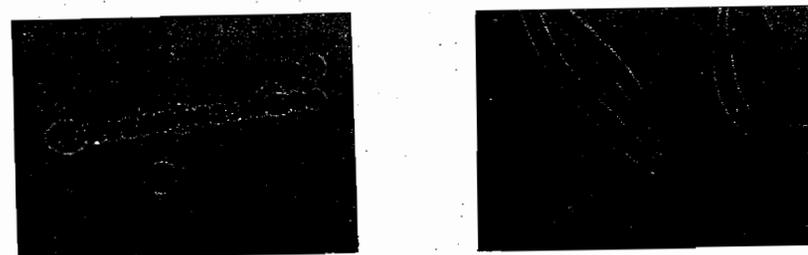


Figura 2. A: filamento unisseriado de *Anabaena variabilis*; B: filamento com ramificação falsa de *Tolypothrix* sp. a: acineto; h: heterocisto; flecha grossa: célula vegetativa diferenciando-se em acineto.

famílias Nostocaceae, Rivulariaceae, Scytomataceae e Stigonemataceae. O primeiro sinal visível do início da diferenciação é o aumento do tamanho da célula vegetativa acompanhada da diminuição e da mobilização dos produtos de reserva (19). Lang e Fay (32) observaram a formação de mais três camadas sobre a camada LIV da parede celular já existente. A mais externa é denominada camada fibrosa, de espessura irregular e composta de polímeros de polissacarídeos; a camada homogênea é mediana e torna-se espessa próximo aos polos da célula, também composta de polissacarídeos; e a mais interna, é a camada laminada, composta de quatro glicolipídios característicos dos heterocistos (32, 74). O heterocisto liga-se à célula vizinha através de conexões extremamente finas localizadas nas paredes do poro, chamadas microplasmodesmos. Através destes microplasmodesmos há passagem de substâncias entre as células (32).

Durante a diferenciação do heterocisto, ocorre a reorganização do sistema de membranas que é acompanhada por profundas mudanças na composição dos pigmentos. Há menores teores de clorofila e carotenóides, mas pouca ou nenhuma ficocianina é encontrada (18, 32). Segundo Stanier e Cohen-Bazire (62), não há síntese de ficobilinas no heterocisto. A ausência da clorofila 670 e das ficobilinas indicam a falta do fotossistema II no heterocisto (20). Desta maneira há ausência da via acíclica do processo fotossintético, contribuindo para prevalecer baixos níveis de O_2 no interior do heterocisto, fato este auxiliado pela alta taxa respiratória que ocorre nestas células (21). Portanto, o heterocisto tem um conjunto de propriedades, não apresentadas pelas células vegetativas, as quais permitem manter a nitrogenase em forma ativa, ainda que o meio externo e as células vegetativas do próprio filamento possuam ou liberem O_2 (62).

ORGANIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

O organismo mais simples é o celular, ou seja, aquele no qual após a divisão celular, ocorre a separação das células (por ex. *Chroococcus*). Alguns gêneros unicelulares possuem diferenciação polar formando um tipo de apressório através do qual se fixam no substrato (por ex. *Chamaesiphon*). Quando após as divisões celulares não há separação das células, formam-se as colônias. Estas terão formas diferentes dependendo da regularidade ou não dos planos de divisão. Quando ocorrem dois planos de divisão celular regulares, há formação de colônias tabulares (por ex. *Merismopaedia*); três planos de divisão celular regulares formar-se-ão colônias cúbicas (por ex. *Euopsis*). A ocorrência de planos irregulares, ao acaso, leva à formação de colônias amorfas, globóides (por ex. *Microcystis*).

Nos organismos filamentosos o plano de divisão é único e regular. Neste caso, utiliza-se o termo tricoma, para designar o conjunto de células adjacentes e o termo filamento para o conjunto tricoma mais a bainha gelatinosa (58). Além dos filamentos unisseriados, simples, não ramificados, por ex. *Anaba-*

na, *Oscillatoria* (Figura 2), pode-se observar organismos filamentosos ramificados. A ramificação pode ser verdadeira, quando ocorre a mudança do plano de divisão celular; desta maneira, existirá sempre uma célula basal da ramificação no filamento principal (por ex. *Hapalosiphon*), ou falsa, devido às divisões celulares rápidas em determinado ponto do filamento provocando rompimento da bainha gelatinosa e posteriormente do próprio tricoma originando ramificação dupla (por ex. *Scytonema*). Se, no entanto, uma célula parar de sofrer divisões celulares por se diferenciar em heterocistos ou por morte celular, a célula vegetativa adjacente poderá continuar crescendo, rompendo a bainha gelatinosa e formando uma ramificação simples (por ex. *Tolypothrix*; Figura 2). Além dos organismos unisseriados, ainda existem aqueles cujos talos são multisseriados (por ex. *Stigonema*).

O crescimento de um filamento em cianobactérias geralmente ocorre através da divisão celular de qualquer célula do tricoma. Contudo, existe um grupo de organismos cujo crescimento é limitado à célula apical, formando-se uma célula basal, que somente sofre divisão uma única vez, originando um filamento diferenciado nas duas extremidades (por ex. *Rivularia*).

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR CIANOBACTÉRIAS DE VIDA LIVRE

Devido à necessidade de aumentar a produção agrícola com custo menor e evitar a degradação de ecossistemas, a fixação biológica de nitrogênio desempenha um papel importante na fertilidade do solo. As cianobactérias por serem auto-suficientes em termos de obtenção de energia e de nitrogênio são consideradas, atualmente, como um excelente biofertilizante (54). Entre os diazotróficos de vida livre, estes organismos são, provavelmente, dos mais significativos na contribuição de nitrogênio fixado nos ecossistemas naturais e agrícolas (6, 72). Segundo Lowendorf (36), a quantidade de nitrogênio fixado por cianobactérias em campos de arroz foi de 0,2 a 39 kg de N/ha.cultura, enquanto que as bactérias do solo e rizosfera situam-se entre 1,2 a 18,3 kg de N/ha.cultura. Em experimentos em vasos, com inoculação de cianobactérias foi estimado, em termos de nitrogênio fixado, a média de 0,416g $N_2/h.cm^2$, ou equivalente a 0,05 g $N_2/dia.m^2$, considerando-se um fotoperíodo médio anual de 11 horas (46). Há grandes divergências entre os valores obtidos de nitrogênio fixado em trabalhos realizados no campo e em casa de vegetação. Fundamentando-se em várias publicações sobre o assunto, Roger e Kulasooriya (52) listaram valores que diversificavam de alguns poucos quilos a 80 kg de N/ha.cultura. Nos ecossistemas, além da contribuição em termos de nitrogênio fixado, as cianobactérias ainda têm um papel ecológico de destaque como colonizadoras primárias:

a) proporcionando condições para o estabelecimento de outros organismos da flora e da fauna;

- b) colaboram na acumulação de húmus;
 c) previnem a erosão, auxiliando na agregação das partículas do solo;
 d) ajudam a manter a umidade do solo (23, 26, 38, 64).

Um dos primeiros trabalhos demonstrando a importância das cianobactérias na fixação de nitrogênio em campos de arroz na Índia é uma publicação de De (9). A prática de inoculação de cianobactérias de vida livre no solo encontra-se ainda em fase experimental de aplicação em grande escala (71). Segundo Roger e Kulasooriya (52) e Roger e Reynaud (53), a inoculação de cianobactérias no solo pode interferir no tamanho e no conteúdo de nitrogênio das plantas, no número dos perfilhos e panículas e na quantidade de grãos produzidos. Pontes (46) demonstrou, em casa de vegetação, que em cultura de arroz inundado, em vasos, cujo solo recebeu adubação básica sem nitrogênio combinado e com inoculação de cianobactérias isoladas do solo (*Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum*, *N. verrucosum* e *Cylindrospermum minutissimum*), as plantas tiveram produção de biomassa e grãos equivalentes àquelas que receberam 50 mg de N/kg de solo e o tratamento proporcionou uma produção de grãos 63% superior àquela observada no tratamento controle, sem adição de nitrogênio combinado (Figura 3 e Quadro 3).

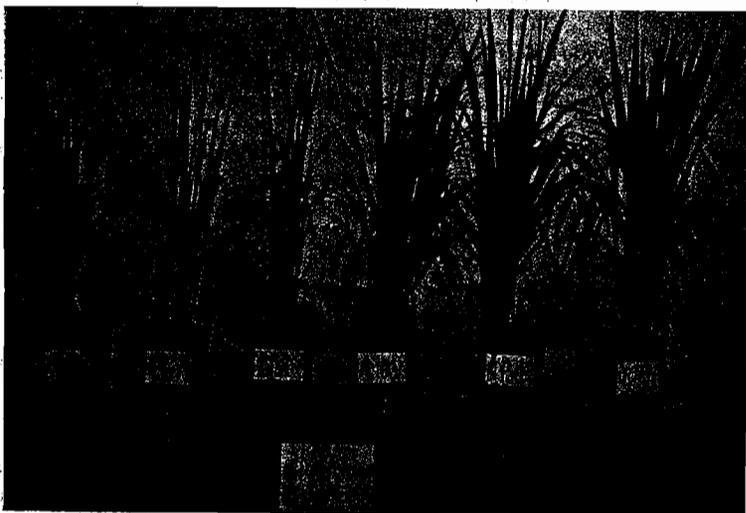


Figura 3. Resultado da inoculação de cianobactérias (CIA) sobre o desenvolvimento das plantas de arroz em comparação com os outros tratamentos efetuados, N0, N50, N100, N150 e N250 (sem nitrogênio; com 50, 100, 150 e 250 ppm de nitrogênio respectivamente).

Quadro 3. Valores médios de peso dos grãos de arroz com casca, das plantas crescidas em solo com diferentes níveis de nitrogênio combinado, após 140 dias do plantio

| N aplicado | Matéria Seca |
|--------------------|---------------------|
| ppm ⁽¹⁾ | g |
| 0 | 7,6a ⁽²⁾ |
| 50 | 11,3b |
| 100 | 17,5c |
| 150 | 22,7d |
| 250 | 23,5d |
| Cianobactéria | 12,5b |

(1) Doses de nitrogênio, em ppm.

(2) As letras iguais após cada valor médio de matéria seca de grãos, indicam diferenças não significativas entre as médias (95% de confiança).

Mesmo sendo consideradas entre os organismos mais auto-suficientes da natureza, as cianobactérias muitas vezes não se desenvolvem bem quando utilizadas como biofertilizantes. Fatores bióticos, tais como, predação por larvas de inseto e zooplâncton e fatores abióticos, tais como temperatura, pH do solo, disponibilidade de nutrientes, podem limitar o crescimento e o estabelecimento de cianobactérias no solo.

A fixação de nitrogênio em cianobactérias, semelhante ao que ocorre com os outros diazotróficos, é inibida pela presença de O₂ (42). É fato bem conhecido a alta sensibilidade da nitrogenase ao O₂ (8, 17, 76). Entre as cianobactérias, a separação espacial e temporal dos processos de fixação de nitrogênio e fotossíntese, são mecanismos protetores da nitrogenase contra o O₂. A separação espacial ficou demonstrada a partir dos trabalhos de Fay et alii (20), Stewart et alii (67) e Van Gorkon (69) onde evidenciaram que o sítio de fixação de N₂ é o heterocisto. Contudo, a síntese da nitrogenase não é restrita a essas células, uma vez que em condições de anaerobiose, as células vegetativas de cianobactérias heterocistadas são induzidas a sintetizá-la (51). A separação temporal foi demonstrada por Mitsui et alii (39) em *Synechococcus* sp. (unicelular, colonial), cujas células realizavam a fotossíntese em presença de luz, e no escuro, fixavam o nitrogênio. Stal e Krumbein (59, 60, 61) também demonstraram tal separação em *Oscillatoria* sp., associada a um mecanismo de ativação e desativação da nitrogenase.

Outro fator que pode levar à inibição da fixação de nitrogênio por cianobactérias, é a presença de nitrogênio combinado no solo (22, 29, 41, 43, 46, 70). Em experimentos realizados em vasos cujo solo foi inoculado com cianobactérias, demonstrou-se que 76% da atividade da nitrogenase foi inibida por cloreto de amônio na concentração de 50 mg de N/kg de solo (46). A mesma autora

evidenciou que *Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum*, *N. verrucosum* e *Cylindrospermum minutissimum*, isoladas do solo e cultivadas em meio de cultura, foram inibidas quanto à fixação de N_2 quando se adicionou 50, 100, 150 e 250 ppm de N, após quatro horas do início do experimento. Simultaneamente à inibição do processo, foi observada a ausência de diferenciação de heterocistos nessas cianobactérias (Figuras 4 e 5).

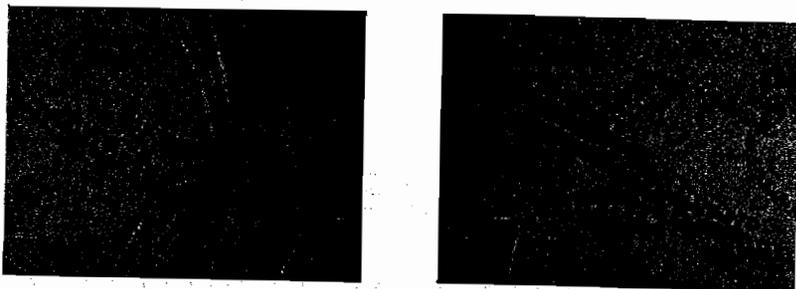


Figura 4. *Anabaena variabilis* - 24h em incubação em meio BG.11 isento de nitrogênio combinado (NO) e com 250 ppm de nitrogênio sob a forma de cloreto de amônio (N250). Observe a diferença da quantidade de heterocistos presentes nos dois tratamentos.

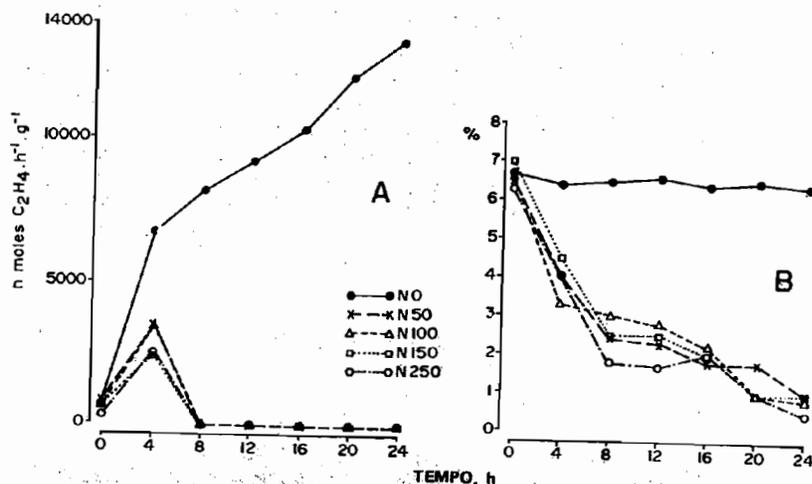


Figura 5. A: atividade da nitrogenase (n moles $C_2H_4/h/g$) e B: frequência de heterocistos (%) em *Anabaena variabilis* durante o período de 24 horas de medida, em crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio: NO sem nitrogênio; N50, N100, N150 e N250 com 50, 100, 150 e 250 ppm N.

CONCLUSÃO

O efeito benéfico da incorporação de cianobactérias no solo parece ser verdadeiro, tendo-se em vista os inúmeros trabalhos realizados na Índia, Tailândia, Japão, Filipinas, etc. Contudo pouco se sabe a respeito da ecologia desses microrganismos, e conseqüentemente, pode-se obter resultados negativos ao se adicionar o inóculo no solo. No Brasil, pouco ou nada se conhece sobre as cianobactérias do solo. Há necessidade de se fazer um levantamento das espécies presentes, determinar suas potencialidades em termos de fixação de nitrogênio, determinar os fatores limitantes do seu crescimento, estabelecimento e fixação de nitrogênio, avaliar sua influência sobre as propriedades do solo e estimar sua contribuição em termos de nitrogênio disponível para plantas cultivadas.

LITERATURA CITADA

1. ALLEN, M.M. Mesosomes in blue-green algae. Arch. Microbiol., New York, 34: 199-206, 1972.
2. ALEXANDER, M. Nitrogen fixation: Nonsymbiotic. In: M. ALEXANDER, ed. Introduction to Soil Microbiology, New York, John Wiley Sons, p. 287-304, 1961.
3. ALEXANDER, M. & WILSON, P.W. Large-scale production of *Azotobacter* for enzymes. Appl. Microbiol., Baltimore, 2:135-140, 1954.
4. BALANDREAU, J.P. Mesure de l'activité nitrogenasique des microorganismes fixateurs libres d'azote de la rhizosphere de quelques graminées. Rev. Écol. Biol. Sol., Paris, 12:273-290, 1975.
5. BOLD, H.D. & WYNNE, M.J. Introduction to the algae, structure and reproduction, 2a., New Jersey, Prentice Hall, 1985. 720 p.
6. BOTHE, H.; YATES, M.G.; CANNON, F.C. Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. In: LAUCHLI, A. & BIELESKI, R.L., eds. Inorganic plant nutrition. Berlin, Springer-Verlag, 1983. p. 241-285 (Enciclopedia of Plant Physiology, 15 A.).
7. BROWN, M.E.; JACKSON, R.M. & BURLINGHAM, S.K. Growth and effect of bacteria introduced into soil. In: GRAY, T.R.G. & PARKINSON, D., eds. The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool, Liverpool University Press, 1968, p. 531-551.
8. BURRIS, R.H. Progress in the biochemistry of nitrogen fixation. Proc. Roy. Soc., London, B, 172:317-347, 1969.
9. DE, P.K. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-fields. Proc. Roy. Soc., London, B, 127:121-139, 1939.

10. DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. & SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 9:119-123, 1977.
11. DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. *R. bras. Biol.*, Rio de Janeiro, 19:251-258, 1959.
12. DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* n. sp.; uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. agrop. bras.*, Rio de Janeiro, 1:357-365, 1966.
13. DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*. Vienna, IAEA, p. 51-68, 1978.
14. DREWS, G. Fine structure and chemical composition of the cell envelopes. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A., eds. *The biology of blue-green algae*. Berkeley, University California Press, 1973. p. 99-116. (Botanical Monographs, V.9).
15. DUNN, J.H. & WOLK, C.P. Composition of the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 103(1):153-158, 1970.
16. DURREL, L.W. & SHIELDS, L.M. Characteristics of soil algae relating to crust formation. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, Laurence, 80:73-79, 1961.
17. EADY, R.R.; SMITH, B.E.; COOK, K.A. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, London, 128:655-675, 1972.
18. FAY, P. Cell differentiation and pigment composition in *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.*, New York, 67:62-70, 1969.
19. FAY, P. The heterocyst. In: CARR, N.F. & WHITTON, B.A. eds. *The biology of blue-green algae*. Berkeley, University California Press, 1973. p. 238-259.
20. FAY, P.; STEWART, W.D.P.; WALSBY, A.E.; FOGG, B.E. Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in the blue-green algae? *Nature*, London, 220:810-812, 1968.
21. FAY, P. & WALSBY, A.E. Metabolic activities of isolated heterocysts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature*, London, 209:94-95, 1966.
22. FOGG, G.E. Nitrogen fixation. In: *Monographium STEWART, W.D.P.*, ed., *Algae: physiology and biochemistry*. Berkeley, University California Press, 1974. p. 560-582.
23. FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P.; WALSBY, A.E. *The blue-green algae*. London, Academic Press, 1973, 459p.
24. FUHS, G.W. Cytochemical examination of blue-green algae. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A., eds. *The biology of blue-green algae*. Berkeley, University California Press, 1973. p. 117-143. (Botanical Monographs, V.9).

25. GRAY, T.R.G. & WILLIAMS, S.T. (eds.). In: *Soil Micro-organisms*. Hong Kong, The Hong Kong Printing Press Ltd., Chap. 1:1-29, 1977.
26. HOLM-HANSEN, O. Ecology, physiology, and biochemistry of blue-green algae. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 22:47-70, 1968.
27. JENSEN, H.L. A survey of biological nitrogen fixation in relation to the world supply of nitrogen. Amsterdam, 4th Int. Congr. Soil Sci. Trans., 1:165-172, 1950.
28. JONES, K. Nitrogen fixation in a salt marsh. *J. Ecol.*, London, 62:553-565, 1974.
29. KULASOORIYA, S.A.; LANG, N.J.; FAY, P. The heterocysts of blue-green algae. III. Differentiation and nitrogenase activity. *Proc. R. Soc. London. B*, 181:199-209, 1972.
30. LAMONT, H.C. Shear orientated microfibrils in the mucilagenous investments of two motile oscillatoriacean blue-green algae. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 97:350-361, 1969.
31. LANG, N.J. The fine structure of blue-green algae. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 22:15-46, 1968.
32. LANG, N.J. & FAY, P. The heterocysts of blue-green algae. II. Details of ultrastructure. *Proc. Roy. Soc.*, London, B., 178:193-203, 1971.
33. LANG, N.J. & FISHER, A. Variation in the fixation image of "structured granules" in *Anabaena*. *Arch. Microbiol.*, New York, 67:173-181, 1969.
34. LANG, N.J. & WHITTON, B.A. Arrangement and structure of thylakoides. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A., eds. *The biology of blue-green algae*. Berkeley, University California Press, 1973. p. 66-79. (Botanical Monographs, V.9).
35. LEAK, L.V. Fine structure of the mucilaginous sheath of *Anabaena* sp. *J. Ultrast. Res.*, New York, 21:61-74, 1967.
36. LOWENDORF, H.S. Biological nitrogen fixation in flooded rice fields. *Cornell Inst. Agric. Mimeo*. 96, Nov. 1982, 75 p.
37. MAGDOFF, F.R. & BOULDIN, D.R. Nitrogen fixation in submerged soil-sand-energy material media and the aerobic-anaerobic interface. *Pl. Soil*, Hague, 33:49-61, 1970.
38. METTING, B. The systematics and ecology of soil algae. *Bot. Rev.*, New York, 47(2):195-312, 1981.
39. MITSUI, A.; KUMAZAWA, S.; TAKAHASHI, A.; IKEMOTO, H.; CAO, S.; ARAI, T. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, 323:720-722, 1986.
40. MOORE, A.W. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant systems. *Soil grty.*, 27:113-128, 1966.

41. MURRY, M.A. & BENEMANN, J.R. Nitrogenase regulation in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, Tokio, 20(7):1391-1401, 1979.
42. MURRY, M.A.; HORNE, A.J.; BENEMANN, J.R. Physiological studies of oxygen protection mechanisms in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 47(3):449-454, 1984.
43. NEILSON, A.; RIPPKA, R.; KUNISAWA, R. Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. A kinetic study. *Arch. Microbiol. New York*, 76:139-150, 1971.
44. PATRICK, W.H. Jr. Nitrogen transformations in submerged soils. In: FRANK J. STEVENSON, eds., *Nitrogen in Agricultural Soils*, 12:449-465.
45. POLINOV, B.B. The first stages of soil formation on massive crystalline rocks. *Pochvovedini* (7), 327-339. 1945. (em russo), citado por Gray & Williams, 1977.
46. PONTES, M.C.F. Contribuição de nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 1988. 161 p. (Tese de Doutorado).
47. POSTGATE, J. The free-living microbes. EDWARD ARNOLD, ed., *Nitrogen Fixation*, London, 1979, p. 33-43. (Studies in Biology no. 92).
48. RICE, W.A. & PAUL, E.A. The organisms and biological process involved in asymbiotic nitrogen fixation in waterlogged soil amended with straw. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 18:715-723, 1972.
49. RICE, W.A.; PAUL, E.A. & WETTER, L.R. The role of anaerobiosis in asymbiotic nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 13:829-836, 1967.
50. RINAUDO, G.; HAMAD-FARES, I. DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation in the rice rizosphere. Methods of measurement and practices suggested to enhance the process. In: A. AYANABA & P. DART, eds., *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics*, John Wiley Sons, 1977.
51. RIPPKA, R. & STANIER, R.Y. The effects of anaerobiosis on nitrogenase synthesis and heterocyst development by nostocacean cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, Oxford, 105:83-94, 1978.
52. ROGER, P.A. & KULASOORIYA, S.A. Blue-green and rice. Los Banos, Philippines. The International Rice Research Institute, 1980. 112 p.
53. ROGER, P.A. & REYNAUD, P.A. Free-living blue-green algae in tropical soils. In: DOMMERGUES, Y.R. & DIEM, H.G., eds., *Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity*. The Hague, Netherlands, Martinus Nijhoff, 1982. p. 147-168.
54. ROGER, P.A. & WATANABE, I. Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Fert. Res.*, Hague, 9(1-2):39-78, 1986.

55. RUSCHEL, A.P. Efeito sazonal sobre o desenvolvimento e fixação biológica de N de diferentes espécies de *Azolla*. *Pesq. agrop. bras.*, Rio de Janeiro, 1985.
56. RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. & HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In: *Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria*. *Ecol. Bull.*, Stockholm, 26:297-303, 1978.
57. RUSCHEL, A.P. & RUSCHEL, A.P. Varietal differences affecting nitrogenase activity in the rizosphere of sugarcane. In: REIS, F.S. DICK, J., eds. *Congress of Int. Soc. of Sugar Technology*, São Paulo, 16, Anais, 1978, p. 1941-1948.
58. SMITH, G.M. *The fresh-water algae of United States*. New York, McGraw-Hill, 1950. 719 p.
59. STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp.. *Arch. Microbiol.*, New York, 143:722-776, 1985.
60. STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp grown under alternating light-dark cycles. *Arch. Microbiol.*, New York, 143:76-71, 1985.
61. STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Arch. Microbiol.*, New York, 149:76-80, 1987.
62. STANIER, R.Y. & COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 31:225-275, 1977.
63. STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MADEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bact. Rev.*, Baltimore, 35(2):171-205, 1971.
64. STARKS, T.L.; SHUBERT, L.E. & TRAINOR, F.E. Ecology of soil algae: a review. *Phycologia*, 20(1):65-80, 1981.
65. STEVENSON, F.J. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: F.J. STEVENSON, ed., *Nitrogen in Agricultural Soils*, Chap. 1:1-42, ASA-CSSA-SSSA, Madison, 1982.
66. STEWART, W.D.P. Some aspects of structure and function in N₂ fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 34:497-586, 1980.
67. STEWART, W.D.P.; HAYSTEAD, A. & PEARSON, H.W. Nitrogenase activity in heterocysts of blue-green algae. *Nature*, London, 224:226-228, 1969.
68. TUFFERY, A.A. Light and electron microscopy of the sheath of blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.*, Oxford, 57:41-50, 1969.
69. VAN GORKON, H.J. Localization of nitrogen fixation. *Nature*, London, 234:231-232, 1972.

70. VASCONCELOS, L. & FAY, P. Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. I - The effect of nitrogen starvation. Arch. Microbiol., New York, 96:271-279, 1974.
71. WATANABE, I. Nitrogen fixation by non-legumes in tropical agriculture with special reference to wetland rice. Pl. Soil, Hague, 90: 343-357, 1986.
72. WETSELAAR, R. & GANRY, R. Nitrogen balance in tropical agrosystems. In: DOMMERGUES, Y.R. & DIEM, H.G., eds., Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. The Hague, Netherlands, Martinus Nijhoff 1982, p. 1-36.
73. WHITNEY, D.E.; WOODWELL, G.M. & HOWARTH, R.W. Nitrogen fixation in Flax Pond. A Long Island Salt Marsh. Limnol. Oceanogr., 20:640-643, 1975.
74. WOLK, C.P. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. Bacteriol. Rev., Baltimore, 37(1):32-101, 1973.
75. WOLK, C.P. Cyanobacteria (blue-green algae). In: CON, E.E. & STUMPF, P.K., eds., The Biochemistry of Plants. New York, Academic Press, 1980, p. 659-686.
76. YATES, M.G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: CON, E.E. & STUMPF, P.K., eds., The Biochemistry of Plants. New York, Academic Press, 1980, p. 1-64.
77. YOSHIDA, T. & YONEYAMA, T. Atmospheric dinitrogen fixation in the flooded rice rizosphere as determined by ^{15}N isotope technique. Soil Sci. Plant Nutr, Tokio, 26:551-559, 1980.

ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS COM CIANOBACTÉRIAS

Marli de F. Fiore⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

As cianobactérias apresentam grande versatilidade em se associarem com os mais diversos tipos de outros seres vivos, formando simbioses com protistas, vegetais inferiores e superiores. Essas associações simbióticas são estabelecidas somente com as cianobactérias heterocistadas, as quais, na simbiose, apresentam maior número de heterocistos e consequentemente, maior atividade de fixação de nitrogênio que quando em vida livre. Em todas as associações, a endófito invade estruturas já existentes, podendo algumas vezes provocar modificações, sem, entretanto, induzir a formação de estruturas especiais (2, 6, 30).

ASSOCIAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E FUNGOS (LÍQUENS)

Os líquens, associações de fungos e algas, têm importância ecológica, pois são habitantes pioneiros de regiões inóspitas da terra, como tundra ártica e desertos, podendo ser importantes também em algumas florestas (36). Os fungos, geralmente um ascomiceto, podem formar associações simbióticas com uma alga verde ou uma cianobactéria, ou ambos os organismos ao mesmo tempo (associação tripartida), sendo que as associações com cianobactérias representam

⁽¹⁾ Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

somente cerca de 8% dos gêneros (14,20). Embora a cianobactéria *Nostoc* seja a mais comum nesse tipo de simbiose, também existem, na natureza, associações com outros gêneros (Quadro 1).

Quadro 1. Associações simbióticas entre cianobactérias e vegetais e fungos (30)

| Vegetais/ fungos | Gênero de cianobactérias | Localização | Quantidade de N fixado kg/ha.ano |
|---------------------|--|---|--|
| Fungos | <i>Nostoc</i> <i>Calothrix</i> <i>Scytonema</i> <i>Stigonema</i> <i>Dichothrix</i> | talo (intercelular) | 1-10 |
| Briófitas | <i>Nostoc</i> | talo (intercelular) | 1-10 |
| Pteridófitas | <i>Anabaena</i> | cavidade das folhas (intercelular) | 10-100 |
| Gimnospermas | <i>Nostoc</i> | nódulos nas raízes (inter e intracelular) | 20 |
| Angiospermas | <i>Nostoc</i> | glândulas axilares (intracelular) | 10-70 |

Os líquens apresentam dois tipos de organização interna. No primeiro tipo, a cianobactéria está casualmente distribuída no interior do talo, enquanto que, no segundo, existem regiões distintas onde ela se desenvolve. Quando, entretanto, os líquens são tripartidos os dois simbiontes estão sempre separados, sendo cada um deles encontrado em zonas ou camadas distintas, ou em estruturas especiais chamadas cefalódia, existentes na parte externa do talo (*Peltigera aphthosa*, *Stereocaulon paschale* e *Placopsis gelida*) ou dentro dele (*Lobaria pulmonaria*) (Figura 1).

Apesar de sua baixa taxa de fixação de nitrogênio (Quadro 1), têm importância na colonização primária das rochas.

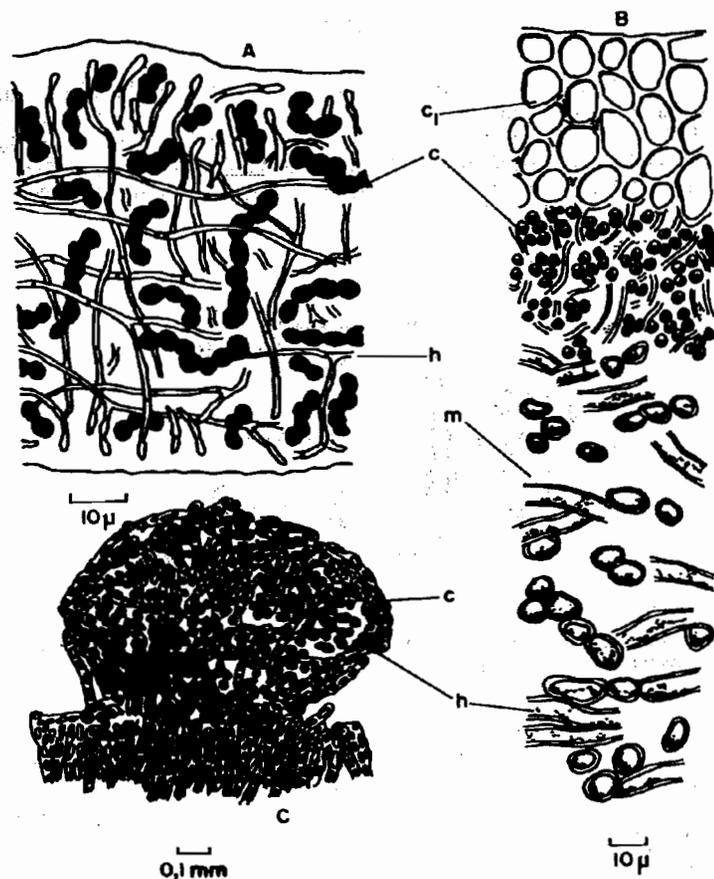


Figura 1. Estrutura de alguns líquens. A) a cianobactéria está distribuída casualmente no interior do talo (*Collema* sp x 950); B) a cianobactéria está localizada em região distinta (*Peltigera horizontalis* x 600); C) Cefalódia x 50. c: cianobactérias, c₁: córtex, h: hifas, m: mucilagem. Reimpressão da figura 4.1, Millbank (20) com permissão de John Wiley & Sons, Inc.

ASSOCIAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E PLANTAS VERDES

BRIÓFITAS

No caso das briófitas, algumas hepáticas são conhecidas por apresentarem simbiose com uma cianobactéria do gênero *Nostoc* (8). Essas hepáticas são pequenas e confinadas a áreas úmidas. A cianobactéria coloniza cavidades cheias de mucilagem existentes na superfície inferior do talo do gametófito, onde ocorre uma alteração morfológica denominada papila (Figura 2), (12,20,29).

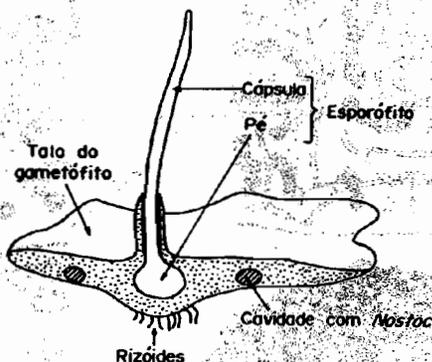


Figura 2. Diagrama de *Anthoceros punctatus* mostrando o arranjo do esporófito e gametófito e a localização da cianobactéria x 10 (Sprenst, 36)

A colônia de *Nostoc*, uma vez instalada na papila, tem a função metabólica de fixar N_2 , dependendo completamente do hospedeiro para suas necessidades de carbono e energia. As células do hospedeiro liberam carbono fixado, provavelmente como sacarose, o qual é translocado para a cianobactéria. Em troca, a *Nostoc* excreta grande quantidade de nitrogênio na forma de amônia (98%), o qual é assimilado pelo gametófito e translocado para o esporófito quando presente (37,38).

Alguns musgos também são capazes de se associarem às cianobactérias, e o potencial de fixação de nitrogênio atmosférico desses, juntamente com algumas hepáticas, tem sido determinado em florestas tropicais úmidas (Quadro 1).

PTERIDÓFITAS

Azolla, uma pequena planta aquática, é o único gênero da ordem das pteridófitas conhecido por apresentar uma associação simbiótica com uma cianobactéria. Esse gênero é comumente encontrado em águas paradas, ou com pouca correnteza, que formam braços de rios e lagos, ou em áreas de cultivo de arroz inundado, das regiões tropicais e temperadas. Existem sete espécies de *Azolla*, as quais são divididas em dois subgêneros de acordo com a morfologia do órgão sexual. No subgênero *Euazolla*, estão incluídas as espécies: *caroliniana*, *filiculoides*, *mexicana*, *microphylla* e *rubra*, enquanto que no *Rhizosperma* inclui-se a *nilotica* e a *pinnata* (variedade *imbricata* e *pinnata*) (19). No Brasil, foram encontradas até o momento três espécies de *Azolla* distribuídas em diversos estados. *A. caroliniana* foi encontrada na Amazônia, Pará, Bahia, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; *A. filiculoides*, no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e *A. microphylla* na Bahia e Paraná (13).

Todas as espécies, normalmente, contêm a cianobactéria chamada *Anabaena azollae*, como simbiote em cavidades especializadas da folha (Figura 3) (22,27). A cianobactéria pode fornecer todo o nitrogênio requerido pela associação através da fixação atmosférica de N_2 e todas as espécies são capazes de crescer na ausência de nitrogênio, bem como usar N-combinado quando disponível (4,24,25).

Importância da *Azolla* em sistemas agrícolas

Essa associação vem sendo empregada há muitos anos no Vietnã e China, como adubo verde em plantações de arroz inundado (18,19,22,26,41) e também na Índia (16, 33, 34). Na maioria dos países que cultivam arroz inundado, o nitrogênio é, com frequência, o nutriente limitante da produtividade, especialmente após o lançamento dos novos cultivares altamente produtivos. O uso de *Azolla* como fonte alternativa ou suplementar de nitrogênio para o arroz tem recebido interesse considerável.

O nitrogênio fixado pela *Azolla* torna-se disponível para o arroz através da liberação desse nutriente, durante o processo de decomposição da planta, o que ocorre após a sua incorporação no solo. Entretanto, cultivo simultâneo da *Azolla* com o arroz também pode favorecer a cultura, embora a quantidade de nitrogênio disponível seja menor. A combinação desses dois sistemas também pode ser empregado, quando conveniente. O valor da *Azolla* como adubo verde é primariamente dependente da quantidade de nitrogênio produzido (Quadro 1). A *Azolla* apresenta relação C/N baixa, o que torna sua decomposição mais rápida, podendo liberar 62-75% do seu nitrogênio, em seis semanas, na forma de amônia (43). Sob condições favoráveis, a *Azolla* tem potencial para suplementar todo o nitrogênio requerido para uma alta produtividade de arroz (23, 28, 40).

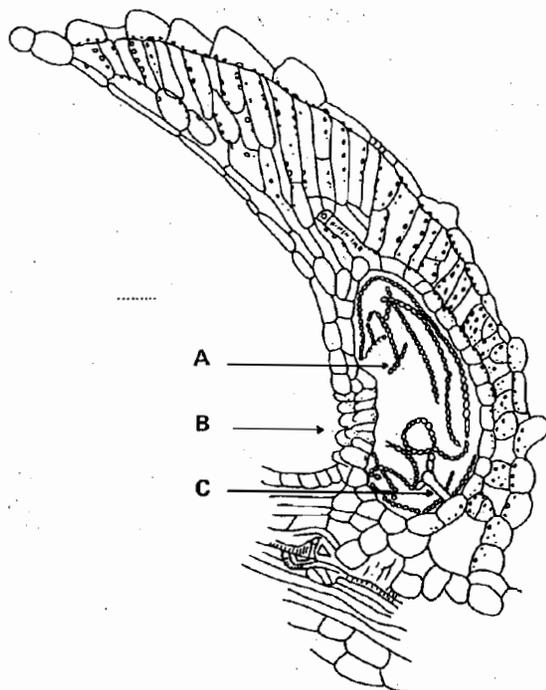


Figura 3. Corte transversal do lóbulo dorsal da folha de *Azolla*. A) filamentos de *Anabaena*; B) pêlo de transferência; C) poro (Millbank, 20).

Aumentos na produção de grãos do arroz de cerca de 10% até mais de 100% já foram obtidos, quando a *Azolla* foi usada como adubo nitrogenado. Alguns resultados obtidos são apresentados no quadro 2.

Apesar do alto potencial, o uso de *Azolla* como adubo verde apresenta limitações relacionadas com o manejo. Além da necessidade de mão-de-obra intensiva, o crescimento e o teor de nitrogênio da *Azolla* são influenciados pelos fatores ambientais, incluindo ação dos ventos e oscilações na superfície d'água (4). O fósforo é frequentemente limitante para o seu crescimento no campo, sendo que, nas regiões tropicais, as altas temperaturas podem ser prejudiciais (44). Por outro lado, a *Azolla* está sujeita ao ataque de várias pragas (17,19) e é sensível a alguns herbicidas usados na cultura do arroz (35).

Quadro 2. Aumentos na produção de grãos de arroz inundado obtidos com o uso de *Azolla*

| Aumentos na produção % | Sistema de aplicação | Referências |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 6 | Simultâneo com o arroz | Singh (33) |
| 25 | Simultâneo com o arroz | Rains & Talley (28) |
| 15-42 | Simultâneo com o arroz | Fiore & Gutbrod (13) |
| 9-38 | Incorporada ao solo | Singh (33) |
| 112 | Incorporada ao solo | Talley et al. (40) |
| 9-57 | Incorporada ao solo | Singh (34) |
| 35-45 | Incorporada ao solo | Watanabe et al. (44) |
| 38-58 | Incorporada ao solo | Partohardjono et al. (23) |
| 22-26 | Incorporada ao solo | Fiore & Gutbrod (13) |
| 26 | Incorporada ao solo | Kannaiyan (16) |
| 216 | Incorporada + cultivo simultâneo | Talley et al. (40) |
| 37-55 | Incorporada + cultivo simultâneo | Fiore & Gutbrod (13) |

Outros usos

Além do uso como adubo verde, a *Azolla* pode ser empregada para controle da população de ervas daninhas, com efeito benéfico, devido à competição da *Azolla* com essas plantas (21) e também como alimento para porcos, patos e peixes (9).

GIMNOSPERMAS

No caso das gimnospermas, a família de plantas *Cycadaceae* está distribuída no hemisfério sul, fazendo parte da flora da África do Sul, América do Sul e Austrália (36). Essa família apresenta raízes laterais modificadas chamadas raízes coralóides. Essas raízes são ageotrópicas, pois ramificam-se dicotomicamente na superfície ou muito perto dela e formam estruturas semelhantes a nódulos, as quais são infectadas por cianobactérias (Figura 4) (10, 11). Embora a formação das raízes coralóides seja independente da presença da cianobactéria, somente aquelas as quais são infectadas por ela persistem (1,15).

As cianobactérias que comumente infectam as cicas são principalmente do gênero *Nostoc* (39). A quantidade de nitrogênio fixado pelas cicas, bem como a capacidade dos nódulos para fixar N_2 de alguns gêneros de cicas, têm sido demonstradas por vários autores (Quadros 1 e 3). As plantas fixam cerca de 3 vezes mais $^{15}N_2$ na presença de luz que no escuro, e o N fixado é distribuído em toda a parte da planta, indicando uma transferência do N fixado (5).

Quadro 3. Determinação da fixação biológica de N_2 na associação entre cianobactérias e cicas

| Gênero | Técnicas usadas | Referência |
|----------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Bowenia</i> | meio livre de N | Bowyer & Skerman (7) |
| <i>Ceratozamia</i> | $^{15}N_2$ | Bond (6) |
| <i>Cycas</i> | $^{15}N_2$ | Watanabe & Kiyohara (42) |
| <i>Dioon</i> | ARA ⁽¹⁾ | Becking (2) |
| <i>Encephalartos</i> | $^{15}N_2$ | Bond (6) |
| <i>Macrozamia</i> | $^{15}N_2$ | Bergersen et al. (5) |
| <i>Stangeria</i> | meio livre de N | Dovin (11) |
| <i>Zamia</i> | meio livre de N | Chaudhuri & Akhtar (10) |

(1) ARA: atividade da nitrogenase determinada pelo método da redução do acetileno.

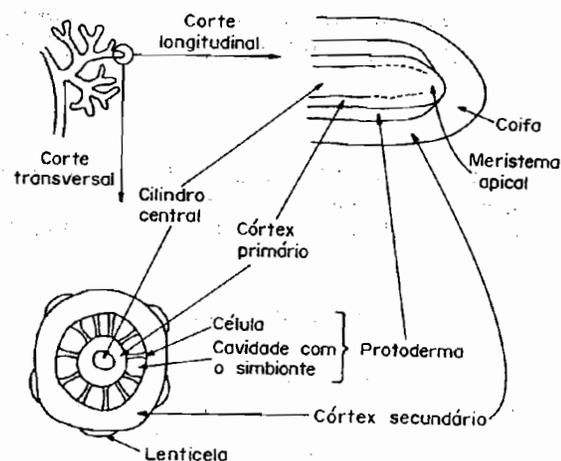


Figura 4. Diagrama ilustrando a estrutura das raízes coralóides e a localização da cianobactéria (Sprent, 36).

ANGIOSPERMAS

Gunnera, um membro da família *Haloragaceae*, está largamente distribuída no hemisfério sul (32). As espécies desse gênero de planta desenvolvem uma associação simbiótica com uma cianobactéria do gênero *Nostoc*, a qual infecta glândulas localizadas nos caules perto da base do pecíolo (Figura 5), sendo



Figura 5. Parte de caule de *Gunnera macrophylla* mostrando a posição das glândulas que contêm *Nostoc* (Becking, 3).

que filamentos de *Nostoc* desenvolvem-se na mucilagem produzida por essas glândulas (3). A frequência de heterocistos da cianobactéria na simbiose é maior (18-81%) que em vida livre (4,2-7,1%) (31) e o seu potencial de fixação de nitrogênio está apresentado no quadro 1.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, E.K. & ALLEN, O.N. Nonleguminous plant symbiosis. In: GILMOUR, C.M. & ALLEN, O.N. eds. Microbiology and soil fertility. In: Annual Biology Colloquium, 25. Proceedings. Corvallis. Oregon State University Press, 1965. p.7-106.
- BECKING, J.H. Symbiosen: stickstoff-bindung. Fortschr. Bot., 34: 459-467, 1972.
- BECKING, J.H. Nitrogen fixation in some natural ecosystems in Indonesia. In: NUTMAN, P.S. ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, 1976. p.539-550.
- BECKING, J.H. Environmental requirements of *Azolla* for use in tropical rice production. Nitrogen and Rice. Los Banos, Laguna, Philippines, International Rice Research Institute. 1979. p.245-274.

5. BERGERSEN, F.J.; KENNEDY, G.S. & WITTMAN, W. Nitrogen fixation in the coraloid roots of *Macrozamia communis* L. Johnson. Austr. J. Biol. Sci., Melbourne, 18:1135-1142, 1965.
6. BOND, G. Fixation of nitrogen by higher plants other than legumes. Ann. Rev. Plant. Physiol., New York, 18:107-126, 1967.
7. BOWYER, J.W. & SKERMAN, V.B.D. Production of axenic cultures of soil-borne and endophyte blue-green algae. J. Gen. Microbiol., Oxford, 54:299-306, 1968.
8. BRASSEL, H.M. & DAVIES, S.K. Nitrogen fixation associated with colonizing Bryophytes. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Amsterdam, Elsevier/North-Holl and Biomedical Press, 1981. p.507.
9. CASSINI, J.R. Feeding behaviour of underyearling hybrids of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and the bighead, *Hypophthalmichthys nobilis* on selected species of aquatic plants. J. Fish Bio., Dorchester, 18(2):127-138, 1981.
10. CHAUDHURI, H. & AKHTAR, A.R. The coral-like roots of *Cycas revoluta*, *Cycas circinalis* and *Zamia floridana* and the alga inhabiting them. J. Indian Bot. Soc., Madras, 10:43-59, 1931.
11. DOVIN, R. Sur la fixation de l'azote libéré par les Myxophytes endophytes des Cycadacées. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Paris. 236:956-958, 1953.
12. DUCKETT, J.G.; PRASAD, A.K.S.K.; DAVIES, D.A. & WALKER, S. A. Cytological analysis of the *Nostoc*-bryophyte relationship. New Phytol., Oxford, 79:349-362, 1977.
13. FIORE, M.F. & GUTBROD, K.G. Use of *Azolla* in Brazil. In: IRRI ed., International Rice Research Institute. *Azolla* Utilization, Los Banos, Laguna, Philippines, 1987. p.123-130.
14. FOGG, G.E., STEWART, W.D.P.; FAY, P. & WALSBY, A.E. The blue green algae. New York. Academic Press, 1973. 459p.
15. GROBBELLAR, N.; STRAUSS, J.M. & GROENEWALD, E.G. Non-leguminous seed plants in Southern Africa which fix nitrogen symbiotically. Pl. Soil, Hague, 1971 p.325-341. (Special Volume.)
16. KANNAIYAN, S. Use of *Azolla* in India. In: IRRI ed. International Rice Research Institute. *Azolla* Utilization. Los Banos, Laguna, Philippines, 1987. p.109-118.
17. LIU, C.C. Use of *Azolla* in rice production in China. Nitrogen and Rice. Los Banos, Laguna, Philippines, International Rice Research Institute. 1979. p.375-394.
18. LIU, C.C.; WEI, W.C. & ZHENG, D.Y. Some advances in *Azolla* research. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E. eds. Advances in nitrogen fixation research. Hague, Martinus Nijhoff, 1984. p.57.

19. LUMPKIN, T.A. & PLUCKNETT, D.L. *Azolla* as a green manure: use and management in crop production. Colorado, Westview Press, 1982. 230p.
20. MILLBANK, J.W. Lower plant associations In: Silver, W.S. ed. A treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology. New York, John Wiley & Sons, 1977. p.675.
21. MOODY, K. Weed fertilizer interactions in rice. Laguna, IRRI research Paper. 1981. 35p. (Series, 64)
22. MOORE, A.W. *Azolla*: Biology and agronomic significance. Bot. Rev., New York, 35:17-34, 1969.
23. PARTOHARDJONO, S.; HENDRIK, V. & BASTAMAN, M. Effect of *Azolla* incorporation, spacing and nitrogen fertilizer application on the growth and yield of wetland rice. Contr. Centr. Res. Inst. Food Crops Bogor, Indonesia, 1983. N 69. p.11-21.
24. PETERS, G.A.; TOIA, R.E.; EVANS, W.R.; CRIST, D.K.; MAYNE, B. & CAND POOLE, R.E. Characterization and comparisons of five N₂-fixing *Azolla-Anabaena* associations. I. Optimization of growth conditions for biomass increase and N content in a controlled environment. Plant Cell. Environ., New York, 3:261-269, 1980.
25. PETERS, G.A.; ITO, O.; TYAGI, V.V.S. & KAPLAN, D. Physiological studies on N₂-fixing *Azolla*. In: LYONS, J.M. ed. Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen. New York. Plenum Publishing Corporation, 1981. p.342-362.
26. PETERS, G.A. & CALVERT, H.E. The *Azolla-Anabaena* symbioses. In: SUBBA RAO, N.S. ed. Advances in agricultural microbiology. Bombay. Oxford and IBH Publ. Co., 1982. p.191-218.
27. PETERS, G.A. & CALVERT, H.E. The *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. In: GOFF, L.J. ed. New York, Cambridge University Press, 1983. p.109-145.
28. RAINS, D.W. & TALLEY, S.N. Use of *Azolla* in North America. Nitrogen and rice. Los Banos, Laguna, Philippines., International Rice Research Institute, 1979. p.419-431.
29. RODGERS, G.A. & STEWART, W.D.P. The cyanophyte-hepatic symbiosis. I. Morphology and physiology. New Phytol., Oxford, 78:441-458, 1977.
30. RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; GARCIA, F.S. & SUBRAMANIAM, P. La fijación de nitrógeno atmosférico. Salamanca, C.S.I.C., 1985. 69p.
31. SILVESTER, W.B. & McNAMARA, P.J. The infection process and ultrastructure of the *Gunnera-Nostoc* symbiosis. New Phytol., Oxford, 77:135-141, 1976.
32. SILVESTER, W.B. Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. eds. A Treatise on dinitrogen fixation, Section IV. New York, John Wiley & Sons, 1977. p.141-150.

33. SINGH, P.K. Multiplication and utilization of fern *Azolla* containing nitrogen-fixing algal symbiont as green manure in rice cultivation. *IL Riso*, 26:125-137, 1977.
34. SINGH, P.K. Use of *Azolla* in rice production in India. Nitrogen and rice. Los Baños, Laguna, Philippines, International Rice Research Institute. 1979. p.407-418.
35. SINGH, P.K. & MISRA, S.P. Effect of herbicides on growth and N₂ fixation of *Azolla pinnata* under field conditions. *J. Biol. Res.*, 2:91-96, 1982.
36. SPRENT, J. The Biology of nitrogen-fixing organisms. London, McGRAW-Hill Book Company (UK) Limited, 1979. 196p.
37. STEWART, W.D.P. & RODGERS, G.A. The cyanophyte-hepatic symbiosis. II. Nitrogen fixation and the interchange of nitrogen and carbon. *New Phytol.*, Oxford, 78:459-471, 1977.
38. STEWART, W.D.P. & RODGERS, G.A. Studies on the symbiotic blue-green algae of *Anthoceros*, *Blasia* and *Peltigera*. *Ecol. Bull.*, London, 26:247-259, 1978.
39. STEWART, W.D.P.; ROWELL, P. & RAI A.N. Symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria. In: STEWART, W.D.P. & GALLON, J.R. Nitrogen fixation. London. Academic Press, 1989. p.239-277.
40. TALLEY, S.N.; TALLEY, B.J. & RAINS, D.W. Nitrogen fixation by *Azolla* in rice fields. In: HOLLAENDER, A. ed. Genetic engineering in nitrogen fixation. New York. Plenum Press, 1977. p.259-281.
41. TUAN, D.T. & THUYET, T.Q. Use of *Azolla* in rice production in Vietnam. Nitrogen and rice. Los Baños, Laguna, Philippines, International Rice Research Institute, 1978. p.395-406.
42. WATANABE, I. & KIYOHARA, T. Symbiotic blue-green algae of lichens, liverworts and cycads. Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. *Plant Cell. Physiol.*, Tokyo, 1963. p.189-196. (Special Volume)
43. WATANABE, I.; ESPINAS, C.R.; BERJA, N.S. & ALIMAGNO, B.V. Utilization of the *Azolla-Anabaena* complex as a nitrogen fertilizer for rice. Laguna, IRRI Research Paper, 1977. 15p. (Series,11)
44. WATANABE, I.; BERJA, N.S. & DEL ROSARIO, D.C. Growth of *Azolla* in paddy field as affected by phosphorus fertilizer. *Soil Sci. Plant Nutr.*, Tokyo, 26:301-307, 1980.

FIXAÇÃO DO N₂ EM LEGUMINOSAS CULTIVADAS EM SOLOS DE CERRADOS

J.R.R. Peres⁽¹⁾, A.R. Suhet⁽¹⁾ & M.A.T. Vargas⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Pelas suas características de localização geográfica, clima e extensão, cerca de 112 milhões de hectares de terras aráveis e potencialmente aptas para qualquer cultivo, os cerrados apresentam-se como uma das alternativas com maior potencial para expansão da fronteira agrícola brasileira. Entretanto, o aproveitamento racional e pleno dos seus recursos depende da solução de alguns fatores limitantes às culturas.

Dentre os problemas relacionados com solo, tem merecido destaque a baixa atividade biológica, devido, principalmente, às condições adversas de acidez e baixa fertilidade. Visando a aumentar a contribuição dos microrganismos para as culturas introduzidas nos cerrados, estão sendo desenvolvidas e adaptadas tecnologias capazes de aumentar a eficiência do uso de insumos, principalmente através da fixação biológica de nitrogênio.

ESTUDO DE CASO

SOJA

A expansão da cultura da soja nos cerrados tornou-se viável principalmente devido aos resultados de trabalhos de pesquisa, que permitiram

⁽¹⁾ EMBRAPA/CPAC, Caixa Postal 08223, CEP 73301, Planaltina (DF).

a redução de seu custo de produção através da substituição da adubação nitrogenada pela inoculação com rizóbios. A variedade IAC-2, utilizada nos solos de primeiro cultivo não nodulava com as estirpes de *B. japonicum* existentes nos inoculantes comerciais à época da introdução da soja nos cerrados. Foi então conduzida uma série de trabalhos para detectar as causas dessa baixa nodulação, bem como, para encontrar meios de melhorar o nível de fixação do nitrogênio (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12). Em um trabalho conjunto de diversas instituições de pesquisa, foi identificada a alta especificidade hospedeira da variedade IAC-2, sendo recomendadas as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587 para uso em inoculantes comerciais, pois eram as únicas capazes de se associarem eficientemente com aquela variedade. As variedades de soja atualmente recomendadas para a região de cerrados não possuem especificidade hospedeira em relação às estirpes de *B. japonicum* e apresentam boa nodulação em solos de primeiro cultivo, mesmo com estirpes sensíveis a antibióticos como a SEMIA 586 e SEMIA 566.

Os trabalhos de pesquisa tiveram continuidade com o isolamento e seleção de estirpes a partir de populações estabelecidas em solos sob cultivo de soja. Para a identificação dos nódulos contendo estirpes mais eficientes, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa de nódulos individuais, desenvolvida por Peres et al. (4). Duas estirpes capazes de promover rendimentos de grãos de até 20% acima dos obtidos com as estirpes comerciais encontram-se em fase de teste para recomendação para uso pelas indústrias de inoculantes.

Além da seleção de estirpes, foram desenvolvidas tecnologias com o objetivo de superar os obstáculos a uma nodulação adequada da soja (5, 6, 11).

FEIJÃO

Embora o feijoeiro seja uma leguminosa capaz de associar-se simbioticamente com estirpes de *Rhizobium*, é prática comum a aplicação de nitrogênio mineral para essa cultura, o que acarreta um aumento significativo no seu custo de produção. Várias têm sido as limitações para se substituir a adubação nitrogenada pela fixação do N_2 . O principal problema tem sido a alta população de estirpes nativas competitivas e de baixa eficiência em fixar N_2 , as quais dificultam o estabelecimento de estirpes mais eficientes introduzidas pela inoculação.

Através da seleção de estirpes eficientes e competitivas, foi obtida a estirpe CPAC-V23 adaptada aos cerrados, que foi capaz de por três anos consecutivos, promover significativos aumentos de nodulação e pequenas elevações de rendimento de grãos (em torno de 100 kg de grãos/ha) em 5 dos 6 cultivares estudados. Essa pequena elevação foi atribuída à senescência precoce dos nódulos, que fez com que a fixação do N_2 se processasse apenas até a floração (Figura 1), decaindo acentuadamente após esse período.

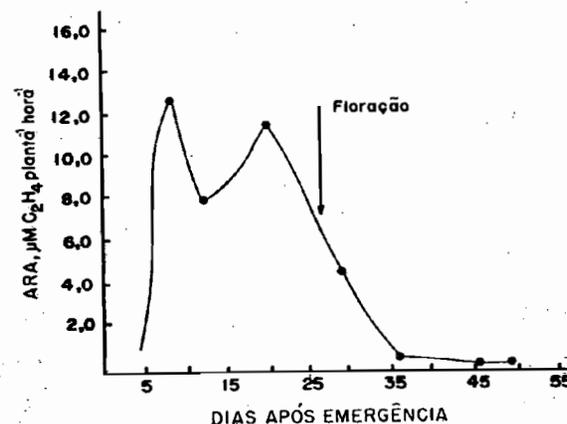


Figura 1. Fixação de N_2 em diferentes estádios de desenvolvimento do feijão, cv. CNPAF-178, medida pela atividade de redução do acetileno (ARA).

Resultados preliminares indicam que uma das causas de senescência precoce dos nódulos do feijoeiro é a alta sensibilidade da planta ao estresse hídrico, com reflexo na nodulação, uma vez que em áreas irrigadas (solo Gley Pouco Húmico de várzea), a inoculação do feijoeiro com estirpes selecionadas induziu a produtividades iguais ou superiores ao tratamento com 100 kg N/ha (Quadro 1). Mesmo as estirpes menos eficientes promoveram uma elevação no rendimento de grãos, uma vez que, nessas áreas, é muito baixa a população nativa de rizóbio.

ERVILHA

A inexistência de estirpes nativas de ervilha nos solos de várzea, onde a possibilidade de manejo de água, aliado ao da fertilidade do solo, favorecem altas produções dessa leguminosa, exigiu um trabalho de seleção de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* para tais condições.

Foram selecionadas as estirpes CPAC EV6 e SEMIA-3007 que podem promover produções de até 3500 kg/ha de ervilha, superiores às obtidas com a aplicação de fertilizantes nitrogenados até a dose de 160 kg N/ha. Apesar de o solo possuir uma capacidade relativamente elevada de suprir N, a inoculação promoveu um aumento de mais de 900 kg em relação à testemunha (Quadro 2).

Esses dados demonstram o grande potencial da inoculação da ervilha em solos de várzea, onde a possibilidade de suplementação hídrica favorece um alto nível de fixação de N₂.

Quadro 1. Resposta do feijoeiro (C-178) à inoculação com diferentes estirpes de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* em um gley pouco húmico de várzea de cerrado

| Tratamento | Peso seco de nódulos | Grãos |
|------------|----------------------|---------|
| | mg | kg/ha |
| Testemunha | 0,1d | 750e |
| 100kg N/ha | 1,5cd | 1991abc |
| CPAC V23 | 9,5cd | 1414cd |
| CO5 | 65,0ab | 1683bcd |
| CNPAF 150 | 30,0bcd | 1689bcd |
| SEMIA 484 | 2,4cd | 1239de |
| 1899 SC | 51,5abc | 2056ab |
| 1640 SS | 25,2bcd | 1727bcd |
| 1020 | 50,9abc | 2354a |
| 1166 | 60,9ab | 1702bcd |
| 1135 | 100,2a | 2526a |
| 1024 | 70,6ab | 1257de |
| CV% | 26,1 | 12,6 |

Os números seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Quadro 2. Nitrogênio e produção de grãos da ervilha (Caprice) em resposta à aplicação de N mineral e à inoculação com diferentes estirpes de *Rhizobium leguminosarum* num solo gley pouco húmico de Cerrado

| Tratamento | Peso de nódulos | Grãos | |
|----------------------|-----------------|---------|----------|
| | | N total | Produção |
| | mg | kg/ha | |
| Testemunha | 0c | 63d | 2558d |
| 40kg N/ha | 1c | 92c | 2869bcd |
| 80kg N/ha | 0c | 91c | 2746cd |
| 120kg N/ha | 0c | 85c | 2554d |
| 160kg N/ha | 0c | 100bc | 2705d |
| CPAC EV6 | 32b | 119ab | 3301abc |
| SEMIA 374 | 2c | 90c | 2869bcd |
| SEMIA 3007 | 67a | 131a | 3395ab |
| Mistura das estirpes | 33b | 132a | 3507a |

Os números seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS

Nos cerrados, tanto em áreas virgens como em cultivadas, observa-se frequentemente a ocorrência natural de nódulos em plantas de várias espécies de leguminosas forrageiras (13). A maior parte das leguminosas forrageiras não apresenta especificidade hospedeira em relação à estirpe de *Bradyrhizobium*. Essas leguminosas, incluindo espécies do gênero *Galactia*, *Calopogonium*, *Dolichos*, *Vigna*, *Zornia*, *Pueraria*, *Neotononia*, *Macroptilium* e outras, são passíveis de inoculação cruzada, ou seja, nodulam efetivamente com estirpes de *Bradyrhizobium* que se associam com outras espécies. Portanto, é pouco provável a sua resposta à inoculação em solos de cerrados.

A falta de resposta de *Stylosanthes* à inoculação, apesar das informações da literatura sobre a especificidade hospedeira de alguns dos seus ecótipos, pode ser atribuída à ocorrência de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. eficientes, nativas nos solos de cerrado. Não houve resposta à adubação com 75 kg de N/ha, aparentemente demonstrando que, dentro do nível de fertilização utilizado, a simbiose com as estirpes nativas foi capaz de suprir todas as necessidades das plantas em nitrogênio (13).

Alguns ecótipos de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* só nodulavam bem após a redução do N mineral do solo, através da adição de palha de arroz. A leucena, entretanto, apresenta alta especificidade hospedeira e beneficia-se de inoculação com estirpes selecionadas.

LITERATURA CITADA

- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja *Glycine max*(L.) Merrill. Agron. Sulriogr., Porto Alegre, 16(2):205-219, 1980.
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 4:139-143, 1981.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Sobrevivência e competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja em um solo de Cerrado. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Londrina, PR, 1981. Anais. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1982. p.766-777.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 8:193-196, 1984.

5. PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. & VARGAS, M.A.T. Sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum* na superfície de sementes da soja inoculada. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, 21(5):489-493, 1986.
6. PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. & VARGAS, M.A.T. Estabelecimento de *Bradyrhizobium japonicum* num solo de cerrado pela inoculação de sementes de arroz. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 13:35-39, 1989.
7. SCOTTI, M.R.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. & DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian Cerrados. *An. Acad. Bras. Ci.*, 54(4):733-738, 1982.
8. VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R. & SUHET, A.R. Reinoculação da soja em função dos serogrupos de *Rhizobium japonicum* predominantes em solos de Cerrados. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981. Anais. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1982. p.715-722.
9. VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R. & SUHET, A.R. Adubação nitrogenada e inoculação da soja em solos de Cerrados. Planaltina. EMBRAPA-CPAC, 1982. 11p. (EMBRAPA-CPAC. Circular Técnica, 13).
10. VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R. & SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e época de aplicação de calcário para a soja (*Glycine max* L.) em um solo sob cerrado. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 17(18):1127-32, 1982.
11. VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculante na soja cultivada em um solo de Cerrado. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 15(3):343-7, 1980.
12. VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeito da inoculação e deficiência hídrica no desenvolvimento da soja em um solo de Cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*, Campinas, 4:17-21, 1980.
13. VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Eficiência de inoculantes comerciais e de estirpes de *Rhizobium* para seis leguminosas forrageiras em um solo de Cerrado. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 16(13):357-62, 1981.

FATORES LIMITANTES À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Avílio A. Franco⁽¹⁾ & Maria Cristina P. Neves⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de nitrogênio está sujeito a uma série de estresses, cada um potencialmente limitante, os quais determinam o sucesso das espécies e de suas associações com organismos superiores em cada ambiente.

A eficiência dos microrganismos diazotróficos em fixar nitrogênio depende, entretanto, tanto de fatores genéticos do microrganismo e do macrossimbionte, como da interação destes com os fatores ambientais.

Na simbiose das leguminosas com o rizóbio, o nódulo representa um abrigo para a bactéria. Porém, ao se tornar parte do sistema simbiótico, o rizóbio passa a ser afetado por qualquer fator que diminua o vigor da planta, como deficiências nutricionais, condições ambientes sub-ótimas, etc.

LIMITAÇÕES DE NATUREZA FISIOLÓGICA

Para fixar nitrogênio, os microrganismos necessitam de redutores e de energia, assim como de mecanismos eficientes para a assimilação da amônia produzida.

⁽¹⁾ EMBRAPA/CNPBS, Km 47 da antiga rodovia Rio-São Paulo, CEP 23851, Seropédica, RJ.

As diversas espécies de microrganismos diazotróficos desenvolveram estratégias distintas para a obtenção de compostos ricos em energia. Microrganismos diazotróficos autotróficos produzem seus carboidratos a partir dos processos foto ou quimiossintéticos. Já os quimiorganotróficos desenvolveram diferentes estratégias para obter a energia necessária ao processo de fixação. Alguns dependem de compostos de carbono da matéria orgânica presente no solo (diazotróficos de vida livre), ou vivem na rizosfera, utilizando compostos orgânicos exsudados pelas raízes ou em associações íntimas com plantas ou animais dos quais recebem os compostos de carbono (Quadro 1).

Exceto para os microrganismos fotolitotróficos, as demais bactérias diazotróficas de vida livre necessitam da energia obtida das ligações carbônicas de compostos orgânicos altamente energéticos. Por isso, para manter altas populações destes microrganismos no solo, é necessário adicionar-se material com alta relação C/N. Nestas condições, taxas de fixação de 30-40 kg ao ano podem ser obtidas. Entretanto, ao contrário das bactérias associadas ou em simbiose com as plantas superiores, até hoje não se tem demonstrado ser a contribuição destes organismos de grande importância econômica para a produção de alimentos. Apresentam, porém, inestimável importância ecológica.

O produto da fixação de nitrogênio é a amônia que precisa ser rapidamente removida ou assimilada por ser tóxica às células. Enquanto que os microrganismos de vida livre fixam N_2 para seu próprio crescimento, sem excretá-lo para o meio ambiente, os microrganismos que vivem em associações complexas com plantas (por exemplo, rizóbio/leguminosas e *Anabaena*/*Azolla*) excretam a amônia produzida que é, logo em seguida, assimilada pelo macrossimbionte (2).

No caso das leguminosas a amônia produzida é rapidamente assimilada em glutamina e glutamato pela célula vegetal e exportada para as demais partes da planta sob a forma de compostos solúveis de pequeno peso molecular e ricos em nitrogênio, como por exemplo, os ureídeos (alantofina, ácido alantóico e citrulina), as amidas (asparagina e glutamina) e vários aminoácidos. A predominância de um tipo de composto sob os outros varia com as diferentes espécies de vegetais (16).

FATORES CLIMÁTICOS

O desenvolvimento de todo ser vivo apresenta um ponto ótimo para temperatura, umidade e pressão de oxigênio. Variações em qualquer um desses fatores terão efeitos diretos ou indiretos sobre o desenvolvimento dos organismos, afetando o processo de fixação de N_2 . As plantas e demais organismos fotolitotróficos apresentam ainda um ótimo para a intensidade e qualidade da luz. Para a *Azolla*, um pouco de sombreamento favorece o seu crescimento (24).

TEMPERATURA

Bactérias livres fixadoras de nitrogênio podem ocorrer em locais de temperaturas extremas desde próximo ao congelamento, até temperaturas superiores a $60^{\circ}C$, tendo grande importância ecológica como desbravadoras de regiões inóspitas.

Quadro 1. Alguns organismos diazotróficos fixadores de nitrogênio

| Organismo | Habitat | Forma de vida |
|---|---|--|
| <i>Rhodospirillum</i> | aquático | fototrófico de vida livre, anaeróbio facultativo |
| <i>Clostridium</i> e <i>Bacillus</i> | ocorrência geral, solo, água doce e salgada, sedimentos; podem viver associados nos intestinos de vários hospedeiros. | quimiorganotrófico de vida livre, aeróbio ou anaeróbio facultativo. |
| <i>Desulfotomaculum</i> | associados a rúmem e intestino de ruminantes. | quimiorganotrófico anaeróbio. |
| <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> | isolados da flora intestinal, porém encontrados em vários habitats, superfície de folhas, fezes, rúmem, solos e água. | quimiorganotrófico anaeróbio facultativo. |
| <i>Citrobacter freundii</i> | associado a intestino de cupim. | quimiorganotrófico anaeróbio. |
| <i>Azotobacter</i> | solos, superfície de raízes. A espécie <i>A. paspali</i> associa-se à raiz de <i>Paspalum notatum</i> cv. Batatais. | quimiorganotrófico de vida livre, aeróbio. |
| <i>Azospirillum</i> e <i>Herbaspirillum</i> | solos, superfície e interior de raízes de gramíneas onde fixam N_2 microaerofilicamente. | quimiorganotróficos de vida livre ou associados. |
| <i>Frankia</i> | nódulos radiculares de <i>Alnus</i> etc., fixa N_2 em simbiose com angiospermas não leguminosas. | quimiorganotrófico aeróbio. |
| <i>Nostoc</i> | ambientes úmidos; ou no interior do caule de <i>Gunnera</i> , etc. | fotolitotróficos aeróbios, vida livre ou em simbiose. |
| <i>Anabaena</i> | ambientes úmidos ou em cavidades foliares de <i>Azolla</i> . | fotolitotróficos, aeróbios, vida livre ou em simbiose. |
| <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizibium</i> | nódulos radiculares em leguminosas. | quimiorganotrófico aeróbio, quando em vida livre usa nitrogênio combinado ou fixa nitrogênio em simbiose com leguminosas; algumas estirpes foram introduzidas a fixar nitrogênio em vida livre no laboratório. |

O funcionamento da simbiose leguminosa-rizóbio é, entretanto, mais sensível a extremos de temperatura do que a planta adubada com N mineral ou a bactéria crescendo em meio de cultura (4). Temperaturas baixas retardam a infecção e formação de nódulos, enquanto que em temperaturas altas, os nódulos se formam, mas são ineficientes. De uma maneira geral, para as leguminosas tropicais, temperaturas diurnas de 25 a 32^o C são ótimas para a nodulação, funcionamento da simbiose e crescimento das plantas, mas existe grande variação entre as espécies (13). A temperatura dos primeiros 5 cm do solo, em regiões tropicais, atinge com frequência 45^o C ou mais. Enquanto a algaroba tem um ótimo de temperatura para a fixação de nitrogênio em torno de 35^o C, o feijoeiro não fixa nitrogênio acima de 34-35^o C, exceto com algumas estirpes de rizóbio que também nodulam espécies florestais (11).

Essas e outras plantas são mais tolerantes a temperaturas elevadas quando supridas com nitrogênio combinado. Temperaturas acima de 35^o C podem causar a perda de plasmídios (que podem inclusive conter os genes *Nif*), e as acima de 46^o C, de um modo geral, afetam a sobrevivência do rizóbio (17). Assim sendo, cuidados devem ser tomados durante o transporte, armazenamento e manuseio dos inoculantes, que não devem ser expostos a temperaturas elevadas.

No campo, o uso de cobertura morta pode minimizar os efeitos de temperaturas adversamente elevadas, durante o estabelecimento da cultura, enquanto a pesquisa tenta obter plantas e bactérias mais tolerantes (Figura 1).

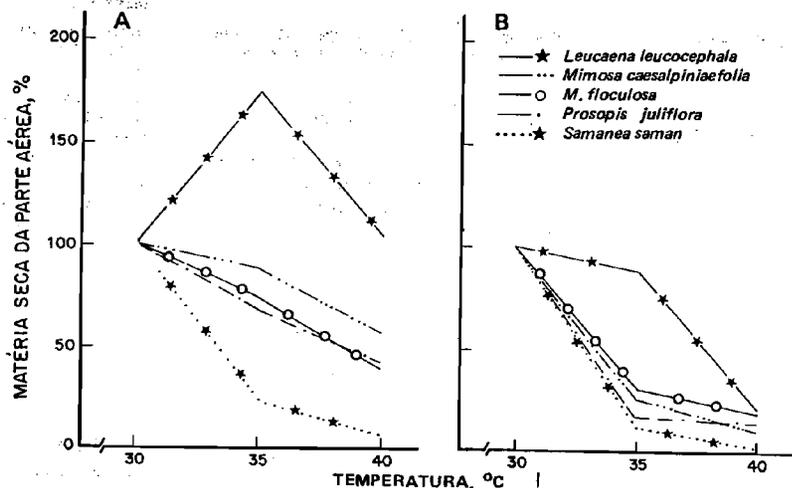


Figura 1. Efeito de altas temperaturas do substrato na produção de matéria seca, em relação à testemunha mantida a 28°C, de plantas adubadas com (A) N mineral ou (B) crescendo com N simbiótico.

UMIDADE E pO₂

Bactérias de vida livre geralmente só apresentam atividade significativa de fixação de nitrogênio na presença de muita umidade no solo, como no caso das cianobactérias (21). Estas bactérias têm grande importância na cultura do arroz inundado, tanto como fixadoras de vida livre, como em simbiose nas folhas de *Azolla* spp. (24).

Nas associações envolvendo leguminosas, a deficiência hídrica diminui a infecção dos pelos absorventes pelo rizóbio, chegando até a inibir completamente a produção dos nódulos. A redução do potencial hídrico no solo também tem efeito direto na atividade de fixação de nitrogênio, principalmente através da diminuição dos produtos da fotossíntese (21). Após o estresse hídrico, nódulos de crescimento indeterminado, nódulos alongados podem reiniciar crescimento e atividade imediatamente, enquanto os nódulos de crescimento determinado (nódulos redondos), dependendo da intensidade do estresse, senescem, e novos nódulos têm que ser formados (21). Exceto por algumas espécies do gênero *Neptunia*, encontradas na região de Marajó e que apresentam nódulos submersos, os nódulos das demais espécies conhecidas não toleram excesso de umidade por tempo prolongado, devido à necessidade de oxigênio, para os processos geradores de energia. Para compensar a pouca disponibilidade de oxigênio, os nódulos aumentam os espaços vazios internamente e aumentam externamente as lentículas que são expansões das células epidérmicas que proporcionam maior superfície para trocas gasosas.

LIMITAÇÕES QUE OCORREM NO SOLO ANTAGONISMO MICROBIANO

Problemas no estabelecimento do rizóbio em alguns solos têm sido atribuídos a predominância de microrganismos antagonísticos. Protozoários, fungos, actinomicetos, bactérias e bacteriófagos podem reduzir o número de rizóbio em condições de laboratório, e o impacto da atividade das diferentes espécies sobre a população de rizóbio têm sido objeto de alguns estudos (5,12,23). Ao contrário do que anteriormente se supunha os bacteriófagos não parecem exercer um papel importante na ecologia do rizóbio (1). Bactérias (como por exemplo *Bdellovibrio*) apesar de atacarem o rizóbio em meio de cultura e reduzirem marcadamente o número de células, também não parecem ser muito importantes sob condições naturais (12). Evidências, entretanto, parecem indicar um relevante papel, para os protozoários, na diminuição da população de rizóbio (8, 9).

Estudos recentes têm demonstrado o papel importante dos actinomicetos no estabelecimento de rizóbio, em solos virgens, principalmente após

preparo e calagem desses solos. O problema parece ser mais preponderante nos solos cultivados do cerrado e da Amazônia onde a perturbação do sistema (limpeza e queimada) favorece o crescimento de *Streptomyces* (actinomiceto produtor de antibióticos como canamicina, cloranfenicol e estreptomycinina), que é encontrado em grandes proporções no solo do cerrado (3). A correção da acidez do solo com a calagem aumentam ainda mais a proporção de estreptomycetos na microbiota dos solos (18), e o resultado prático desse fenômeno é a necessidade de as estirpes de rizóbio se tornarem resistentes aos antibióticos produzidos, para que haja estabelecimento na rizosfera das leguminosas e posterior formação de nódulos. As estirpes de rizóbio para soja que predominam nas áreas de cerrado são geralmente resistentes a 80 mg/ml de estreptomycinina ou mais, e maior resistência natural a antibióticos foi também observada, quando se comparavam estirpes nativas de rizóbio isolados de *Stylosanthes* crescendo em áreas cultivada, em contraposição com estirpes isoladas de plantas coletadas em áreas virgens de cerrado (20).

PRAGAS

Em outros países tem sido observado que larvas de vários insetos se alimentam de nódulos. Recentemente, foi observado em várias partes do Brasil que larvas de *Ceratoma* (um besouro pequeno, esverdeado com pintas amarelo-laranja nas asas), se alimentam dos nódulos, enquanto que as formas adultas se alimentam das folhas, principalmente de feijoeiro e soja.

DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o que tem maior efeito sobre a fixação biológica de N_2 . É importante salientar que só há fixação de N_2 em situações de deficiência deste elemento. Por outro lado, é necessário que haja disponibilidade de N combinado para o crescimento do rizóbio até o início da fixação de N_2 . Na simbiose das leguminosas, o suprimento de N mineral atua: (a) no processo da infecção; (b) no número de nódulos formados; e (c) na taxa de fixação de N_2 . O crescimento dos nódulos é mais sensível ao excesso de N que a atividade da nitrogenase, e ambos são muito mais sensíveis que a infecção e eventos iniciais da formação do nódulo. Por outro lado, pequenas doses de N estimulam o crescimento da planta e, conseqüentemente, podem aumentar a massa de nódulos produzidos. O excesso de nitrato diminui a intensidade na deformação dos pelos absorventes, a adesão do rizóbio à parede do pelo absorvente e o número de cordões de infecção, ao mesmo tempo em que aumenta o número de abortos dos eventos iniciais da infecção. O efeito do nitrato nestes eventos é ainda matéria de disputa; entretanto, existem algumas evidências indicando que o ácido indol-acético (AIA), necessário para a infecção, é destruído por nitrito, que é o primeiro produto da redução de nitrato para a assimilação de N. O nitrito também reage com a leg-hemoglobina, inativando-a. O efeito do N-combinado no crescimento dos

nódulos manifesta-se pela diminuição do tamanho das células do nódulo. Além destes efeitos deve-se ainda considerar que, com alta disponibilidade de N para o crescimento da parte aérea, há uma redução dos fotossintatos que chegam aos nódulos (22).

OUTROS FATORES DO SOLO

Os estresses do solo não se limitam à disponibilidade de nitrogênio e problemas de antagonismo microbiano. Foi estimado que 75% dos solos tropicais apresentam problemas de erosão; 45%, de estresse hídrico; 25-30%, de compactação, 7%, de salinidade-alcalinidade; 35%, problemas de acidez; e 80%, de deficiência de fósforo (15). Outros nutrientes tornam-se deficientes, principalmente a partir da correção do solo como, por exemplo, o zinco, após calagem e adubação fosfática, e o potássio, enxofre e molibdênio, após alguns anos de cultivo. De uma maneira geral, plantas dependentes da fixação biológica de N_2 são mais sensíveis aos estresses do solo do que plantas adubadas com N mineral.

ACIDEZ

Nas zonas equatoriais, onde a precipitação excede a evapotranspiração durante a maior parte do ano, os solos apresentam-se altamente intemperizados e ácidos com deficiência de Ca e Mg, toxidez de Al^{3+} e, com menor frequência, toxidez de Mn.

A maioria das bactérias fixadoras de nitrogênio, livres no solo ou associadas às raízes das plantas, é pouco tolerante à acidez em meio de cultura. As bactérias do gênero *Beijerinckia* são as mais tolerantes. Em solo entretanto, *Azotobacter paspali* predomina em raízes de grama batatais (*Paspalum notatum*), mesmo com pH abaixo de 5,0 e *Azospirillum* spp. tem sido isolados de raízes e solos com pH abaixo de 4,5. Mais recentemente, foi isolado um *Acetobacter* sp., de raízes de cana-de-açúcar, capaz de fixar nitrogênio em pH 3,0.

Devido à adaptabilidade das bactérias, é relativamente fácil selecionar mutantes tolerantes a baixo pH, enquanto que o crescimento da maioria das plantas no mesmo pH é prejudicado. Nas leguminosas sensíveis, tanto ao pH em si (atividade dos íons H^+), como à toxidez de Al^{3+} , em condições de baixa disponibilidade de Ca^{2+} , diminuem a infecção e o início da produção de nódulos (Figura 2). Uma vez dentro da raiz, o rizóbio fica protegido e os estresses passam a ser sentidos indiretamente pelo efeito que têm na planta. A faixa crítica para ocorrer nodulação varia com a espécie ou mesmo dentro da espécie (15).

A maioria das espécies tropicais são tolerantes a níveis relativamente altos de acidez (pH 4,5 - 4,8), podendo-se destacar o caupi, como produtora

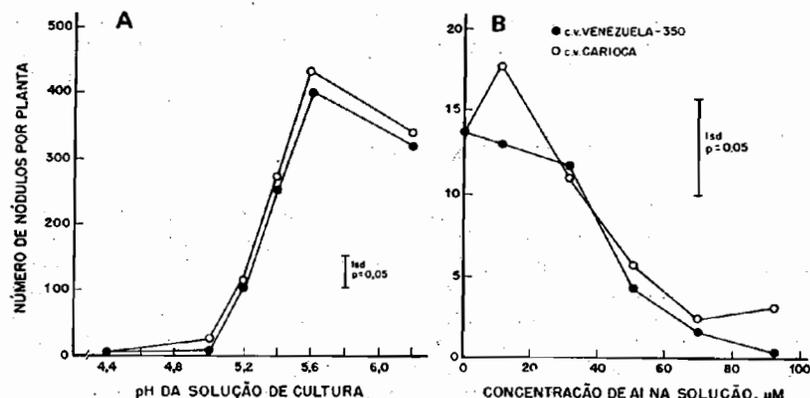


Figura 2. Efeito do (A) pH e (B) Al^{3+} na nodulação do feijoeiro em solução (dados de Franco & Munns, 6)

de grãos, o estilosante, como forrageira e a bracatinga, como espécie arbórea muito importante para recuperação de solos erodidos no sul do país.

Mesmo com uma espécie sensível como o feijoeiro, é possível selecionar cultivares mais adaptados a solos ácidos (Quadro 2) (6, 7). Tem sido também observado que a planta pode aumentar o pH na rizosfera, favorecendo o crescimento de bactérias incapazes de crescer no solo longe das raízes (19).

A falta de nodulação em condições de acidez pode ser causada tanto pela acidez em si, como pela deficiência de Ca, já que tanto a adição de Ca, como

Quadro 2. Seleção de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tolerantes a acidez. (Médias de 4 repetições)

| Cultivar de feijão | Nódulos/planta ⁽¹⁾ | | | Produção de grãos | | |
|--------------------|-------------------------------|-----|-----|-------------------|-------|-------|
| | pH do solo | | | pH do solo | | |
| | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 4,5 | 5,0 | 5,5 |
| | nº | | | kg/ha | | |
| CNF 145 | 8 | 8 | 19 | 1.720 | 1.793 | 1.988 |
| CNF 155 | 7 | 18 | 13 | 1.220 | 1.557 | 1.507 |
| A 222 | 14 | 10 | 24 | 1.435 | 1.512 | 1.293 |
| BAT 304 | 6 | 9 | 9 | 831 | 899 | 755 |
| CD 43 | 12 | 9 | 15 | 1.396 | 1.409 | 1.355 |
| Negro Argel | 23 | 31 | 41 | 1.550 | 1.508 | 1.505 |

(1) Plantas colhidas 20 dias após o plantio.

a exposição temporária das raízes inoculadas a pH 5,5 proporcionam aumento na produção de nódulos. Depois de formados, a atividade dos nódulos é afetada em menor intensidade pela acidez (6, 7).

Plantas fixando nitrogênio (N_2 entra na forma neutra), pela maior absorção de cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) do que de ânions (Cl^- , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}), abaixam o pH da rizosfera por deixar um saldo positivo de H^+ no solo (15). Dados experimentais mostram que são necessários em torno de 250 kg/ha de calcário, para manter inalterado o pH de um solo com baixo poder tampão, onde ocorreu fixação biológica de 70 kg de N (10). No caso da adubação verde, quando não há remoção de grãos ou parte aérea, as bases são retornadas ao solo e não ocorre a acidificação do mesmo.

Associada à acidez, em alguns planosolos e oxisolos, ocorre toxidez de manganês, afetando a nodulação de estirpes de rizóbio sensíveis, efeitos estes que são eliminados com calagem para pH 5,5.

DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES MINERAIS

A deficiência de fósforo, comum em solos ácidos, é causada pela imobilização por adsorção dos íons fosfatos nos colóides de óxidos de ferro e alumínio e argilas do tipo 1:1, presentes nesses solos. Isso faz com que formas solúveis de adubos fosfáticos tornem-se rapidamente não disponíveis às plantas e, em menor intensidade, aos microrganismos. Apesar de demandar alta quantidade de fósforo para a fixação de nitrogênio, o sistema radicular das leguminosas, por sua geometria, é mais restrito do que o das gramíneas, tornando as leguminosas mais dependentes de micorrizas vesículo-arbusculares. A adição de fosfatos naturais, que têm solubilidade aumentada em condições ácidas, apresenta-se como uma alternativa para o manejo da adubação de P nesses solos, principalmente em pastagens e reflorestamentos (14).

Além das leguminosas, a cultura em que se observa maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio é, sem dúvida, o arroz inundado, onde, além da fixação que ocorre junto à raiz, tem-se a grande contribuição das cianobactérias livres na água ou em simbiose com *Azolla*. Quanto à *Azolla*, a deficiência de fósforo e altas temperaturas têm sido os principais fatores limitantes à sua utilização nas regiões brasileiras produtoras de arroz. A *Azolla* é sensível à deficiência de cálcio e micronutrientes, porém as limitações são menos pronunciadas, em áreas onde a lâmina de água é estreita (5cm) (24).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos sistemas simbióticos, o processo de fixação do nitrogênio é o resultado final de uma complexa interação envolvendo o hospedeiro, o microrgra-

nismo diazotrófico e o ambiente. Nas leguminosas, o nódulo confere proteção contra os fatores adversos, porém o êxito no desenvolvimento de um complexo sistema é ameaçado em cada uma das inúmeras etapas.

Nas leguminosas, por exemplo, que é o sistema simbiótico mais estudado, a fixação do nitrogênio depende de uma série de eventos envolvendo o macro e o microssimbionte, que devem estar perfeitamente sincronizados. Para que a fixação ocorra, o rizóbio deve alcançar a rizosfera da planta hospedeira apropriada e multiplicar-se. Nesta etapa, a bactéria sofre tanto antagonismo dos demais microrganismos habitantes da rizosfera, quanto os efeitos de fatores ambientais como temperatura e acidez do solo, ou pode ser afetada, por aplicações de fungicidas nas sementes. Em seguida, o rizóbio precisa ser reconhecido pela planta, penetrar nas células da epiderme da raiz e chegar até o córtex. Estas etapas dependem da compatibilidade entre o hospedeiro e a bactéria, que, em alguns casos, é altamente específica. As plantas podem apresentar fatores não nodulantes, geneticamente controlados. Estas etapas também são grandemente afetadas pelo pH do sistema (21).

A seguir, o rizóbio induz a proliferação das células corticais, infectando-as e formando o nódulo, etapa que depende do correto balanceamento de fatores de crescimento entre os dois parceiros e que é grandemente afetada pela compatibilidade entre os simbiossiontes e pelo regime de temperatura.

Na etapa seguinte, a bactéria sofre modificações morfológicas e fisiológicas, transformando-se em bacteróide. Há interações específicas entre os dois parceiros e a planta hospedeira parece proporcionar um ambiente adequado à transformação e à disponibilidade de nutrientes minerais, como o cobalto, para a produção da leg-hemoglobina e o molibdênio, que é o elemento chave da nitrogenase.

Com o nódulo pronto, é necessário estabelecer um sistema vascular de ligação entre o nódulo e a raiz, para que o rizóbio possa receber os compostos de carbono da planta, e esta, os produtos nitrogenados resultantes da atividade dos nódulos, cuja manutenção em funcionamento é fortemente condicionada por fatores ambientais (principalmente temperatura e umidade) e fisiológicas da planta.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Ecology of *Rhizobium*. In: Alexander, M. ed., Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology and Physiology. New York, Plenum Press. 1984, p. 38-50.
2. BERGERSEN, F.J. Root nodules of legumes: Structure and Functions. Chichester, Research Studies Press, 1982, 164p. (Botanical Research Studies Series, 1).

3. COELHO, R.R.R. e DROZDOWICZ, A. 1978. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. Rev. Ecol. Biol. Sol., Paris, 15(4):459-473. 1978.
4. CUNHA, C.O. e FRANCO, A.A. Efeito de altas temperaturas na nodulação e crescimento de 10 leguminosas arbóreas. An. Acad. bras. de Ci., Rio de Janeiro. 60(3): 380-381. 1988.
5. DANSO, S.K.A., KEYA, S.O. e ALEXANDER, M. Protozoa and the decline of *Rhizobium* population added to soil. Can. J. Microbiol. Ottawa, 21:884-895, 1975.
6. FRANCO, A.A. e MUNNS, D.N. Acidity and aluminum restraints on nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. Soil Sci. Soc. Amer. J. Madison, 46(2):276-301, 1982 a.
7. FRANCO, A.A. e MUNNS, D.N. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. in solution culture. Plant Soil, Hague, 66:149-160, 1982 b.
8. HABTE, M. e ALEXANDER, M. Further evidence for the regulation of bacterial population in soil by protozoa. Arch. Microbiol., New York, 113:181-183, 1977.
9. HABTE, M. e ALEXANDER, M. Protozoan density and coexistence of protozoan predators and bacterial prey. Ecology, Durham, 59:140-146, 1978.
10. HELYAR, K.R. Nitrogen cycling and soil acidification. J. Aust. Agric. Sci., Sidney, 42:217-221, 1976.
11. HUNGRIA, M. e FRANCO, A.A. Obtenção de estirpes de *Rhizobium* para inoculação do feijoeiro em condições de altas temperaturas. In: CONGRESSO E FEIRA NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 1, Rio de Janeiro. Programa e resumos... Rio de Janeiro., Associação Brasileira das empresas de Biotecnologia, 1988. n.p.
12. KEYA, S.O. e ALEXANDER, M. Factors affecting growth of *Bdellovibrio* on *Rhizobium*. Arch. Microbiol., New York, 103:37-43, 1975.
13. LIE, T.A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. Plant. Soil, Hague, 1971. p. 117-127. Special volume.
14. MARSCHNER, H. e ROMHELD, V. In vivo measurement of root-induced pH changes at soil root interface: Effect of plant species and nitrogen source. Z. Pflanzenphysiol. Bot., Stuttgart, 111:241-251, 1983.
15. MUNNS, D.N. e FRANCO, A.A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM, P. H. & HARRIS, S. C, eds. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Cali, CIAT, 1982, p. 133-152.
16. NEVES, M.C.P. e HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. CRC Crit. Rev. Plant Sci., Boca Raton, 6(3):267-321, 1987.

17. OZAWA, T., TAKEMI, A. e YAMAGUCHI, M. Decrease in the proportion of cells capable of inducing nodules of the population of *Rhizobium japonicum* introduced into soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30(4):479-484, 1984.
18. RAMOS, M.L.G. Influência do calcário e cobertura morta na competitividade e persistência da estirpe C05 e nas características da população nativa de *Rhizobium phaseoli*. Itaguaí, RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985. 134p.
19. RIBEIRO JR., W.Q., LOPES, E.S. e FRANCO, A.A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11(3): 275-282, 1987.
20. SCOTTI, M.R.M.M.L., SÁ, M.N.H., VARGAS, M.A.T. e DÖBEREINER, J. Susceptibility of *Rhizobium* strains to antibiotics: A possible reason for legume inoculation failure in cerrado soil. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. eds. *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Cali, CIAT Publications, 1982, p. 195-200.
21. SPRENT, J. *The Biology of Nitrogen-fixing Organisms*. London, McGraw-Hill, 1979, 196p. (European Plant Biology Series).
22. STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N-fixation by nitrate. *Crc. Rev. Plant Sci.*, Boca Raton, 7(1):1-23, 1988.
23. VIDOR, C. e MILLER, R.H. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by quantitative fluorescent antibody technique (FA). *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 12:483-487, 1980.
24. WATANABE, I. e ROGER, P.A. Nitrogen fixation in wetland rice field. In: SUBBA RAO, N.S. ed. *Current developments in biological nitrogen fixation*. New Delhi, Edward Arnold, 1984, p. 237-276.

TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DO FÓSFORO

Siu Mui Tsai⁽¹⁾ & Raffaella Rossetto⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial à vida. Suas funções no metabolismo animal, vegetal e protista são tão importantes, que a maioria dos processos metabólicos de qualquer organismo é dependente da presença desse elemento. Devido à sua essencialidade, o fósforo não pode ser substituído por nenhum outro elemento nos sistemas biológicos.

Do ponto de vista ecológico, é provável que o fósforo seja o elemento mais importante para os organismos vivos, pois, segundo Hutchinson (9) e Mc Elroy (11):

a) é encontrado nesses organismos, em concentrações consideravelmente superiores que as fontes de onde é retirado;

b) participa de processos de transferência de energia, sendo componente de moléculas como o ADP e ATP, que dirigem direta ou indiretamente, todos os processos de vida que requerem energia; e

c) a deficiência de fósforo é o fator que mais freqüentemente limita a reprodução e a produtividade, à exceção da água. Sendo parte integrante das moléculas de DNA e RNA, o fósforo participa de processos de reprodução e transmissão dos caracteres genéticos dos organismos.

Nos solos das regiões tropicais e subtropicais, a maior parte do fósforo encontra-se em formas pouco disponíveis às plantas, fator que, freqüen-

⁽¹⁾ Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP, Caixa Postal 96, Piracicaba, CEP 13400, SP.

temente, tem limitado as produções agrícolas, tornando a agricultura, nessas regiões, praticamente dependente de adições de fertilizantes fosfáticos.

CICLO DO FÓSFORO

A exemplo de uma série de outros elementos como o C, H, O, N e S, o P circula através da terra, água, ar e organismos vivos, formando um ciclo biogeoquímico (15).

O ciclo do fósforo difere dos demais, pelo fato de que as quantidades de fósforo encontradas na atmosfera são tão reduzidas, que muitos autores consideram que o fósforo não completa um verdadeiro ciclo na natureza, ou, ao menos, que este ciclo seja interrompido no compartimento atmosfera. Pouco se conhece sobre a ocorrência de fósforo na atmosfera. Não se observou ainda, nenhum composto gasoso estável de fósforo, mas sabe-se que ele se encontra nesse compartimento, adsorvido a outros materiais, e é proveniente da combustão de material orgânico, partículas de solo em suspensão (poeira), ou porções de espuma do mar carregadas pelo vento (14).

O grande reservatório de fósforo é a litosfera (ver Quadro 1). O fosfato entra na biosfera, ao ser absorvido pelas plantas e microrganismos, e retorna ao solo, após a decomposição da matéria orgânica proveniente de plantas, animais e microrganismos (Figura 1).

Grandes quantidades de fósforo são perdidas anualmente por erosão e são levadas pelos rios até os oceanos. Estima-se que 3,5 milhões de toneladas de P são perdidas anualmente dessa forma. Nos oceanos o fósforo se

Quadro 1. Principais reservatórios de fósforo (15)

| | P total (10^{12} kg) |
|--------------------------|-------------------------|
| Terra | |
| solo | 96-160 |
| rochas minerais | 19 |
| biota | 2,6 |
| água doce (P dissolvido) | 0,090 |
| Oceanos | |
| sedimentos | 840.000 |
| dissolvido (inorgânico) | 80 |
| detritos (partículas) | 0,65 |
| biota | 0,65-0,12 |

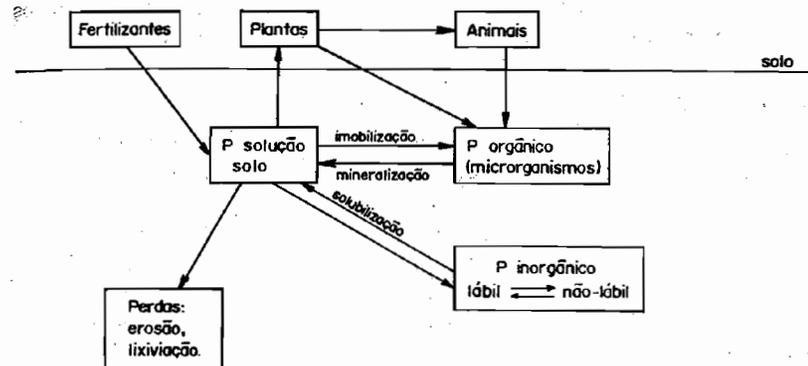


Figura 1. Ciclo do fósforo no solo.

precipita como fosfato de Ca pouco solúvel, e apenas uma pequena parte retorna ao ciclo, através do guano produzido por aves marinhas e de peixes utilizados na alimentação humana (5). Por essas razões, além do esgotamento do solo provocado pela retirada constante de nutrientes pelas culturas e das reações químicas do P, que o tornam menos disponível às plantas, a agricultura depende, cada vez mais, de adições de fertilizantes fosfáticos.

FÓSFORO DO SOLO

O fósforo do solo ocorre quase exclusivamente como ortofosfatos derivados do ácido H_3PO_4 (10), que se combina em compostos de cálcio, ferro, alumínio e na matéria orgânica.

Os fosfatos do solo podem ser, portanto, subdivididos em dois grandes grupos: fosfatos inorgânicos e orgânicos. Nos fosfatos inorgânicos, os íons H^+ do ácido fosfórico são substituídos por cátions formando sais. Nos fosfatos orgânicos, um ou mais íons H^+ são eliminados, e ligações ésteres são formadas, sendo que, os demais íons H^+ podem ser substituídos por cátions.

FÓSFORO INORGÂNICO

O fósforo inorgânico é encontrado nos solos em formas cristalinas, amorfas, adsorvidas ao complexo coloidal ou na solução do solo.

Os fosfatos cristalinos encontrados mais freqüentemente são os fosfatos de cálcio, ferro e alumínio e estão relacionados no quadro 2.

Quadro 2. Principais fosfatos inorgânicos encontrados nos solos

| Tipo | Mineral | Composição |
|-------------------|---------------------|--|
| Fosfato de cálcio | hidroxiapatita | $3 \text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ |
| | oxiapatita | $3 \text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaO}$ |
| | fluorapatita | $3 \text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaF}_2$ |
| | carbonatoapatita | $3 \text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3$ |
| | fosfato tricálcico | $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ |
| Fosfatos de Fe | fosfato bicálcico | Ca HPO_4 |
| | fosfato monocálcico | $\text{Ca} (\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ |
| Fosfatos de Fe | vivianita | $\text{Fe}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| | estrengita | $\text{Fe PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Fosfato de Al | variscita | $\text{Al PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |

A maior parte do fósforo do solo é proveniente da fluorapatita e hidroxiapatita. Os fosfatos mono e bicálcico são muito importantes para a fertilidade de solos e nutrição mineral devido à sua solubilidade (10).

Outras formas de fosfato inorgânico que podem ocorrer nos solos são: fosfatos adsorvidos ao complexo coloidal e fosfatos ocultos nos hidróxidos de Fe, Al e Mn.

Os fosfatos de Ca, Fe e Al são pouco solúveis, e os fosfatos adsorvidos aos colóides do solo podem ser trocados ou permanecer fixados em formas pouco disponíveis às plantas, de maneira que, na solução do solo, o fósforo se encontra em quantidades pequenas (entre 0,02 e 0,2 ppm, sendo freqüentemente menores que 0,1 ppm), nas formas dissociadas do ácido fosfórico, H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} , dependendo do pH do meio. O H_2PO_4^- predomina em pH entre 2,0 a 7,0 e o HPO_4^{2-} predomina em solos com pH maior do que 7,0. Nessa faixa de pH, as quantidades de H_3PO_4 e PO_4^{3-} são negligenciáveis. Como grande parte dos solos brasileiros apresenta reação ácida (pH menor do que 7,0), o H_2PO_4^- é a principal forma de fósforo absorvido pelas plantas nas nossas condições (6).

FÓSFORO ORGÂNICO

O fósforo orgânico do solo é proveniente de restos vegetais e animais, que formam a matéria orgânica do solo, e de protoplasma e produtos metabólicos microbianos.

As frações orgânicas de fósforo nos solos não são totalmente conhecidas. Estima-se que apenas 50 a 70% do P orgânico do solo foi até hoje identificado, a maior parte como ésteres de fosfato (18).

Aproximadamente 30% do P orgânico total corresponde a compostos ainda não caracterizados, sendo que pequena percentagem são açúcares fosfatados e coenzimas.

Nos solos, o P orgânico corresponde normalmente entre 25 e 75% do P total. Em casos extremos, pode atingir 3 a 85% (6).

Os principais compostos orgânicos de fósforo e sua contribuição para o P orgânico dos solos estão relacionados no quadro 3.

Quadro 3. Formas de P orgânico do solo e respectivas percentagens estimadas em relação ao P orgânico total (18)

| Formas de P orgânico | P |
|----------------------|------|
| Fosfatos de inositol | > 60 |
| Ácidos nucléicos | 5-10 |
| Fosfolipídeos | < 1 |
| Outros | 30 |

Fosfatos de Inositol

Inositol é um açúcar homocíclico que forma uma série de ésteres com o fosfato (2).

Os fosfatos de inositol podem ter de 1 a 6 átomos de P para cada grupo de inositol. O hexafosfato é predominante, seguido do pentafosfato, sendo que o tri, o bi e o monofosfato existem em pequenas quantidades. Por outro lado, o grupo inositol pode ocorrer em várias formas isoméricas (1), sendo que o myo-inositol é comumente encontrado na natureza, tendo sido isolado de plantas, animais e culturas puras de microrganismos (2).

O hexafosfato de inositol, também chamado de ácido fítico, pode dar origem a sais de Ca e Mg, denominados fitina. Por muitos anos se pensou que a presença de hexafosfato de inositol no solo tivesse sido originada por vegetais, mas dados recentes indicam que a origem é provavelmente microbiana (17).

Ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos existem nas células vivas em duas formas distintas: o ácido ribonucleico (RNA) e o desoxirribonucleico (DNA), que são sintetizados por microrganismos no solo durante a decomposição da matéria orgânica.

Nos ácidos nucleicos, o fosfato é ligado a um açúcar ribose no RNA, ou desoxirribose no DNA por ligações ésteres.

Os métodos para quantificação e identificação dos ácidos nucleicos nos solos baseiam-se nas quantidades de nucleotídeos ou bases nitrogenadas liberados por hidrólise das frações de matéria orgânica do solo. As proporções relativas das bases nitrogenadas indicam que os ácidos nucleicos encontrados no solo são predominantemente de origem microbiana (2).

Nas células bacterianas, a maior quantidade de fósforo está nas moléculas de RNA. Esse ácido nucleico apresenta 1/3 e, às vezes, 1/2 de todo o P das bactérias. Como as células microbianas são ricas em ácidos nucleicos, é possível que grande parte desses ácidos encontrados no solo estejam ainda ligados no interior das células dos microrganismos. Após a morte das células, os ácidos nucleicos podem então ser mineralizados.

Fosfolipídeos

Fosfolipídeos são compostos onde o fosfato se combina a um lipídeo. Nos fosfatídeos, um grupo de fosfolipídeos que inclui a lecitina e a cefalina, o fosfato é ligado a uma base nitrogenada por ligações ésteres. Assim como os ácidos nucleicos, os fosfolipídeos são componentes de toda matéria viva.

A lecitina (fosfatidil colina) e a cefalina (fosfatidil etanolamina) são os fosfolipídeos predominantes no solo (2).

A concentração de fosfolipídeos nas células bacterianas varia muito, de acordo com a espécie e idade do microrganismo, sendo que, normalmente, representam menos de 10% do total de fósforo das células.

Outras Formas

As paredes das células bacterianas contêm uma série de ésteres, como os ácidos teicóicos, comuns nas paredes das bactérias gram positivas, que, juntamente com ácidos carboxílicos fosforilados, ácidos urônicos, coenzimas e alguns açúcares fosfatados, podem fazer parte das frações orgânicas do solo.

TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DO P NO SOLO SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS INORGÂNICOS

As plantas absorvem fósforo quase exclusivamente da solução do solo. O fosfato inorgânico insolúvel deve passar portanto para a solução do solo antes de ser absorvido. A solubilização microbiológica de fosfatos inorgânicos é detalhada no capítulo 18.

MINERALIZAÇÃO DO FÓSFORO ORGÂNICO

Ao decomporem a matéria orgânica, os microrganismos podem liberar elementos como N, P, S e micronutrientes que estavam contidos nas moléculas orgânicas. Este processo é denominado Mineralização. O contrário, ou seja, a utilização de P no metabolismo microbiano, refere-se à Imobilização. Ambos os processos podem ocorrer simultaneamente, sendo que a predominância de um deles pode significar aumentos ou decréscimos de P na solução do solo.

A mineralização da matéria orgânica depende de vários fatores, como a composição do material orgânico, as populações de microrganismos envolvidos, temperatura, umidade, aeração e pH do solo e práticas culturais, como adições de fertilizantes, entre outros (1, 16).

A mineralização é maior a temperaturas acima de 30° C. O pH próximo à neutralidade também favorece a mineralização. Esses fatores, além de um teor de umidade e aeração adequados, promovem o desenvolvimento de populações de microrganismos decompositores no solo. A alternância entre condições de muita umidade e seca, também favorece a mineralização.

A taxa de mineralização é diretamente correlacionada com as quantidades de substrato a ser decomposto. Quanto à composição da matéria orgânica, muitos autores acreditam que as proporções de P existentes na matéria orgânica a ser decomposta, estariam diretamente relacionadas com as quantidades de P na solução do solo. Ou seja, a razão C/P da matéria orgânica determinaria a predominância de reações de mineralização ou imobilização (2). Neste caso, haveria um nível crítico para a razão C/P, abaixo do qual ocorreria predominância de mineralização e, acima, imobilização. O problema ocorre em se determinar qual seria o nível crítico da razão C/P. Existem várias estimativas obtidas em trabalhos científicos, sendo que uma das mais baixas obtidas foi 55 e a mais alta 300 (20). Um valor, de certa forma considerado por vários autores como o nível crítico da razão C/P, é 200. Sob este enfoque, a mineralização de N, S e P da matéria orgânica ocorreria devido à oxidação de C a CO₂ pelos microrganismos, em taxas similares à relação estequiométrica que existiria entre C:N:S:P na matéria orgânica, onde os microrganismos estariam oxidando o carbono para obter energia.

Atualmente, uma nova hipótese tem sido estudada para a ciclagem dos elementos contidos na matéria orgânica. Os autores consideram que os elementos ligados ao carbono: nitrogênio (C-N) e parte do enxofre (C-S) seriam mineralizados como resultado da oxidação do C a CO₂ pelos microrganismos. Já os elementos contidos em ligações ésteres (C-O-P e C-O-S) seriam mineralizados devido à ausência do elemento no ambiente (13). Mc Gill (12) chamou este processo de mineralização bioquímica, porque ocorre em grande parte fora das células por atividade enzimática e seria controlada pela necessidade do elemento em si em vez de ser pela necessidade de energia. Este modelo prevê a possibilidade de que

um elemento possa se acumular no solo, independentemente do que ocorre com os outros elementos, ou da relação estequiométrica que existia na matéria orgânica inicialmente. Assim, explicar-se-ia o fato de que, em vários solos, em diferentes condições, têm-se observado que, nem a taxa de adição de matéria orgânica, nem o conteúdo de fósforo dessa matéria orgânica influenciaram o conteúdo de fósforo orgânico do solo (2, 3).

As enzimas envolvidas na mineralização da matéria orgânica são coletivamente chamadas de fosfatases. No grupo das fosfatases, incluem-se as:

a) **Fitases** - As fitases agem no hexafosfato de inositol removendo fosfatos um a um, formando penta, tetra, tri, bi, monofosfato e finalmente liberando inositol. São largamente produzidas por microrganismos de várias espécies: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (1). Alguns microrganismos excretam a fitase, enquanto outros a mantêm intracelularmente.

Apesar de a existência de fitases nos solos ser generalizada e de muitos microrganismos terem mostrado "in vitro", a atividade da enzima por eles sintetizada, os polifosfatos de inositol podem estar adsorvidos aos colóides do solo, onde não são facilmente acessíveis às enzimas. Conseqüentemente, os polifosfatos de inositol se acumulam no solo, constituindo a maior percentagem de P orgânico (8).

b) **Nucleases** - Os ácidos nucléicos são rapidamente decompostos no solo. As enzimas nucleases despolimerizam as moléculas de DNA e RNA (desoxirribonuclease e ribonuclease, respectivamente). Moléculas de DNA também podem ficar adsorvidas aos colóides do solo e protegidas da ação das nucleases microbianas (8).

c) **Fosfolipases** - Bactérias, fungos e actinomicetos podem utilizar fosfolipídeos como fonte de fósforo. O fosfato é liberado dos fosfolipídeos através de hidrólise enzimática.

As raízes das plantas também produzem enzimas fosfatases que, juntamente com as fosfatases microbianas, atuam na mineralização da matéria orgânica e podem contribuir para a nutrição de plantas.

O uso de um composto contendo *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, conhecido como *fosfobacterim*, foi bastante difundido na União Soviética, com o intuito de promover maior mineralização da matéria orgânica. A dosagem de 5 kg/ha do composto seria responsável por aumentos da ordem de 10% nas produções agrícolas (7). Embora várias espécies de *Bacillus* sejam reconhecidas decompositoras de matéria orgânica, acredita-se que o estímulo no crescimento de plantas pode ter-se dado, devido ao efeito de produção de auxinas e giberelinas por estas bactérias (4, 19).

IMOBILIZAÇÃO DO FÓSFORO

Durante a decomposição da matéria orgânica pelos microrganismos, determinadas quantidades de fósforo vão sendo assimiladas para a formação e o desenvolvimento de suas células. A imobilização refere-se à utilização, pelos microrganismos, de fosfatos disponíveis, incorporando-os em moléculas de ácidos nucléicos e fosfolipídeos, entre outras.

Adições de matéria orgânica geralmente estimulam o crescimento de populações microbianas, havendo uma conseqüente demanda por fósforo. As bactérias e os actinomicetos acumulam mais fósforo (1,5 a 2,5% da sua matéria seca) que os fungos (0,5 a 1,0%) ou plantas (0,05 a 0,5%) (8).

Quando se adiciona matéria orgânica com alta razão C/P, os microrganismos podem assimilar o fosfato disponível, predominando imobilização, podendo inclusive ocorrer certa competição entre as plantas e os microrganismos pelo fósforo disponível do solo. Quando a razão C/P diminui, a mineralização passa a predominar.

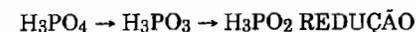
O fósforo imobilizado nas células microbianas é liberado quando o microrganismo morre, tornando-se novamente disponível às plantas. Uma série de ésteres vão sendo liberados ao solo com a morte dos microrganismos. Alguns ésteres serão rapidamente decompostos tendo pequena permanência no solo, enquanto outros são adsorvidos aos minerais de argila onde se acumulam a níveis relativamente altos (2).

REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO

O composto mais oxidado de fósforo é o ortofosfato.

Alguns microrganismos quimiorganotróficos, como bactérias, fungos e actinomicetos, podem assimilar fosfito (HPO_3^{2-}) e oxidá-lo a fosfato no interior das células, formando compostos orgânicos de fósforo (1).

Reações de redução do ortofosfato podem também ocorrer, sendo que *Clostridium butyricum* e *Escherichia coli* foram capazes de reduzir o fosfato em culturas puras. É provável que as reações de redução sejam significativas apenas em solos alagados, sendo que faltam ainda maiores informações sobre o assunto.



DEGRADAÇÃO MICROBIANA DE DEFENSIVOS FOSFORADOS

Existem vários compostos fosforados utilizados como defensivos. Ao contrário dos defensivos clorados, os fosforados são degradados rapidamente, permanecendo pouco tempo no ambiente e nos sistemas biológicos.

O quadro 4 mostra os principais defensivos fosforados.

Quadro 4. Principais defensivos fosforados

| |
|---|
| Inseticidas |
| Sistêmicos: demeton, dissulfotom, forate, mevinfós |
| Não- sistêmicos: diazinom, paratiom, malatiom, azinfós, fentiom |
| Cloro-fosforados: carbofenotiom, diclorfós, triclorfom, agritox |
| Fumigantes: fosfina |
| Fungicidas |
| edifentós, pirazofós, IBP |
| Herbicidas |
| glifosato, merfós, bensulide |

A hidrólise enzimática converte rapidamente a maioria dos defensivos em compostos não tóxicos, solúveis em água. Muitos deles são triésteres, e nesses casos a hidrólise é iniciada por fosforotriesterases, muito comuns em sistemas biológicos (Capítulo 24).

CONCLUSÕES

Apesar dos grandes progressos obtidos nos últimos anos, no estudo das reações do fósforo no solo, vários processos ainda não foram completamente elucidados, sendo que compostos específicos necessitam ser identificados. Dentre as frações orgânicas, por exemplo, estima-se que 30% correspondam a formas ainda não caracterizadas.

O ciclo do P no solo é um processo dinâmico, onde ocorrem transformações entre formas orgânicas e inorgânicas. Alguns processos como a solubilização de P inorgânico, a mineralização e a imobilização de P orgânico, envolvem microrganismos e são de considerável importância porque as reações do P no solo têm consequências diretas para a nutrição mineral de plantas e para a utilização eficiente de fertilizantes e matéria orgânica.

Com os avanços ocorridos na área de fixação biológica de nitrogênio, introduzindo-se sistemas planta-bactéria eficientes na fixação de nitrogênio, existe uma expectativa análoga no campo do fósforo. Pesquisas recentes mostram que plantas infectadas por fungos micorrízicos são capazes de utilizar mais eficientemente o P, principalmente quando este se encontra presente em baixas concentrações na solução do solo, abrindo novas perspectivas para o progresso da agricultura (Capítulos 19, 20 e 21).

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology, New York, John Wiley & Sons, 2 ed., 1977, 333-349 p.
- ANDERSON, G. Assessing Organic Phosphorus in Soil. In: KWASANEH F., SAMPLE, E. & KAMPRAH E.J., eds. The Role of Phosphorus in Agriculture. Madison, Am. Soc. Agron., Madison, 1980, 411-431.
- BARROW, N.J. Phosphorus in Soil Organic Matter. Soils Fert., Harpenden, 24:169-173, 1961.
- COOSGROVE, D.J. Microbial Transformations in the Phosphorus Cycle. In: M. ALEXANDER ed., Advances in Microbial Ecology. New York, Plenum Press, 1977, 95-134 p.
- EPSTEIN, E. Nutrição Mineral de Plantas, Princípios e Perspectivas. São Paulo, EDUSP, 1975, 18-19 p.
- FASSBENDER, H.W. Química de Suelos com Ênfase em Suelos de America Latina. Inst Interam. Ciênc. Agríc. San Jose, 1980, 2 ed., 398 p.
- GRAY, T.R.G. & WILLIAMS, S.T. Soil Microorganisms. London, Longman Group, 1977, 3 ed., 193-196 p.
- HAYMAN, D.S. Phosphorus Cycling by Soil Microorganisms and Plant Roots. In: Walker, N. ed. Soil Microbiology, a Critical Review. London, Butterworths, 1975, 67-91.
- HUTCHINSON, G.E. The Biosphere. Scientific American. 223:45-53, 1970.
- MALAVOLTA, E. Manual de Química Agrícola. Ed. Ceres, 255-291, 1976.
- MC ELROY, W.D. Fisiologia e Bioquímica da Célula. São Paulo, Edgard Bluchner/USP ed., 1972, 144 p.
- MC GILL, W.B. A Concept Regarding Comparative C, N, S and P Cycling Through Soil Organic Matter. 71st. Ann. Meeting, Am. Soc. Agron., Agronomy Abstract, Madison, 1979, 165 p.

13. MC GILL, W.B. & COLE, C.V. Comparative Aspects of Cycling of Organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, Amsterdam, 26:267-286, 1981.
14. PIERROU, U. The Global Phosphorus Cycle. In: SVENSSON, B.H. & SODERLUNG, R., eds. Nitrogen, Phosphorus, and Sulfur-Global Cycles, SCOPE Report 7, Ecol. Bull. Stockholm, 22:75-88, 1976.
15. RITCHEY, J.E. The Phosphorus Cycle. In: BOLIN, B. & COOK, R.B. eds. The Major Biogeochemical Cycles and their Interactions. SCOPE 21, John Wiley & Sons, New York, 1983, 51-56.
16. STEVENSON, F.J. Organic Acids in Soils. In: Mc LAREN, A.D. & PETERSON, G.H., eds., *Soil Biochemistry*, New York, Marcel Dekker Inc., 1:119-146, 1967.
17. STEVENSON, F.J. Cycles of Soil, C, N, P, S, micronutrients. New York, John Wiley & Sons, 1986, 231-284.
18. STEWART, J.W.B. & MC KERCHER, R.B. Phosphorus Cycle. In: BURNS, R.G. & SLATER, J.H. eds., *Experimental Microbial Ecology*, Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1982, 221-237.
19. SPEIR, T.W. & ROSS, D.J. Soil Phosphatase and Sulphatase. In: BURNS, R.G. ed., *Soil Enzymes*, London, Academic Press, 1978, 197-250 p.
20. WHITE, R.E. Pathways of Phosphorus in Soil. In: HUCKER, T.H.G. & CATROUX, G., eds., *Phosphorus in Sewage Sludge and Animal Waste Slurries*, Holland, D. Reidel Publ. Comp., 1981, 21-46p.

SOLUBILIZAÇÃO MICROBIANA DE FOSFATOS

Augusto F. Eira⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Considerando as funções fisiológicas desempenhadas pelo fósforo no mundo vivo, ao lado de fatores do solo que limitam sua disponibilidade à nutrição vegetal, e a atual dependência externa do Brasil em relação ao enxofre utilizado na indústria de superfosfatos, a solubilização biológica de fosfatos naturais assume, principalmente para o Brasil e América Latina (solos tropicais), um papel de destaque mas, ao mesmo tempo, insipiente e futurista.

Dentre as linhas mestras sugeridas no Simpósio sobre Fertilizantes na Agricultura Brasileira, em 1984, encontram-se diretamente ligadas à Microbiologia algumas delas, a saber :

a) a possibilidade de utilizar o processo da redução anaeróbia do fosfogesso por bactérias que utilizam o sulfato como receptor terminal de elétrons, tais como *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Bacillus* e outras (12, 13);

b) a aplicação da biogeoquímica para solubilização de fosfatos naturais de rocha:

- em pilhas, por lixiviação bacteriana de minérios de baixo teor (9, 33) e

- diretamente no campo, através da mistura de minérios de S e rochas fosfáticas, para a solubilização do fósforo através de bactérias quimiolitotróficas oxidantes do enxofre (23, 24); e

⁽¹⁾ Departamento de Defesa Fitossanitária - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Campus de Botucatu - UNESP, São Paulo.

c) a elevação da eficiência do aproveitamento de rochas fosfáticas, como fertilizantes de aplicação direta na agricultura, mediante técnicas que envolvam um manejo mais adequado dos fosfatos em solos brasileiros, considerando-se a dinâmica do sistema solo/planta/microrganismo/fertilizante.

Nas duas últimas metas inclui-se a solubilização biológica de fosfatos naturais, que será discutida neste capítulo com o intuito de canalizar à agricultura a extensa literatura que, embora conduzida em sua maior parte in vitro, poderá evidenciar a necessidade de novas opções para o manejo de adubos fosfáticos em solos tropicais.

MICROBIOLOGIA DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS NATURAIS

A partir do início deste século, simultaneamente com o progresso da Microbiologia Agrícola, Stoklasa atraiu a atenção dos estudiosos da época para o papel que os microrganismos do solo desempenhavam nas transformações de compostos fosfáticos incorporados ao solo (31). Mas, somente em 1949, Gerretsen (10) confirmou essa hipótese, demonstrando que a nutrição das plantas, a partir de fosfatos insolúveis, é bem melhor em "solos vivos" do que em solos esterilizados.

Posteriormente, muitos autores estudaram a influência de populações microbianas no solo, ou culturas isoladas de fungos e bactérias, na liberação ou mobilização de íons fosfato a partir de fosfatos naturais insolúveis (2,3,4,15,16,18,22,26).

A maioria desses trabalhos foi realizada in vitro e refere-se ao isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfatos insolúveis, em diferentes solos e rizosfera de culturas (8,15,16,25).

Pela análise geral dos resultados desses isolamentos, infere-se que a população de microrganismos solubilizadores de fosfatos insolúveis está presente em todos os solos e que varia em função do tipo de solo, vegetação natural, pH, temperatura, teor de matéria orgânica, tipo de fosfato natural e outras variáveis nutricionais do solo e dos meios de cultura utilizados para os testes in vitro (7,10,15,21,25,30).

Dentre os microrganismos solubilizadores de fosfatos, as bactérias, actinomicetos e fungos têm sido frequentemente isolados. Para alguns autores, as bactérias (principalmente as de metabolismo quimiolitotrófico) mostraram-se mais eficientes, enquanto que, para outros, os fungos foram mais eficientes, embora menos frequentes.

Os gêneros mais comumente isolados têm sido:

Bactérias: *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Erwinia*, *Brevibacterium*.

Fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Oidiodendron*, *Pseudogymnoascus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Fusidium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Cunninghamella*, *Thielavia*, *Mucor*, *Coniothyrium*.

Quanto à sua natureza química, independentemente da classe de organismo que os produz, existem basicamente três classes de agentes de solubilização:

- ácidos minerais fracos: H_2CO_3 formado a partir das excreções radiculares de CO_2 e do metabolismo respiratório dos microrganismos;

- ácidos minerais fortes: H_2SO_4 , HNO_2 e HNO_3 formados respectivamente, na oxidação de formas reduzidas de enxofre e nitrogênio por bactérias quimiolitotróficas; e

ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico, oxálico, glucônico e outros formados no metabolismo intermediário de organismos quimiorganotróficos, ou excretados pelas raízes de plantas superiores.

SOLUBILIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS QUIMIOLITOTRÓFICOS

Nesse grupo, as principais bactérias citadas como solubilizadoras de fosfatos naturais são:

Thiobacillus ferrooxidans (33, 34)

Thiobacillus spp (19, 23, 24, 31)

Nitrosomonas (19, 31)

As reações químicas pelas quais essas bactérias produzem ácidos encontram-se detalhadas nos capítulos 8 e 22. A ilustração dos ácidos agindo na solubilização de fosfatos encontra-se na figura 1.

Swaby (30) misturou, em proporções definidas, solo, enxofre e fosfato natural, inoculado com *Thiobacillus* (o que chamou de BIOSUPER). Sob condições controladas de temperatura e umidade, observou que, após determinado tempo, até 80% do fósforo contido no fosfato natural era solubilizado. A utilização desse biofertilizante apresentou resultados positivos em pastagens nas regiões tropicais da Austrália (5). Entretanto, as regiões temperadas apresentam limitações quanto à baixa atividade de *Thiobacillus* e, conseqüentemente, baixa liberação de fosfatos solúveis. O quadro 1 apresenta os dados obtidos em um experimento realizado no estado de São Paulo, com capim colômbio, onde se observou que a

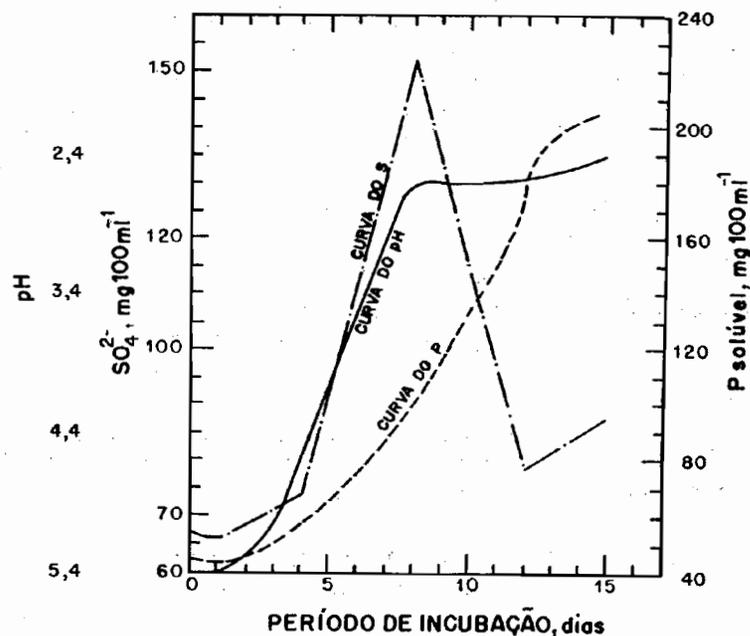


Figura 1. Curso da sulfo-oxidação, solubilização de fosfato tricálcico e variação do pH, na incubação de *Thiobacillus thiooxidans* em meio líquido enriquecido para quimiolitotróficos aeróbios (Waksman, 34).

Quadro 1. Efeito de adição de enxofre a três fosfatos de rocha na produção de matéria seca e conteúdo de fósforo em capim coloniário (Lombardi et al., 17)

| Fosfato de rocha 200mg P ₂ O ₅ /kg solo | Produção | | Conteúdo P | |
|--|----------|----------------------|------------|----------------------|
| | Sem S | Com S | Sem S | Com S |
| | g | | mg | |
| Catalão | 9,27 | 17,77 | 8,25 | 15,86 |
| Alvorada | 27,97 | 36,07 ⁽¹⁾ | 26,30 | 42,90 ⁽¹⁾ |
| Hiperfósforo | 32,73 | 37,27 | 36,33 | 51,85 |

⁽¹⁾ Difere do tratamento sem enxofre ao nível de 5% probabilidade (Tukey).

presença de fosfato Alvorada, junto com a adição de enxofre, promoveu significativos ganhos de matéria seca e conteúdo de fósforo.

Recentemente, foi demonstrado em experimentação de campo com pastagens (*Lolium perene*) que o BIOSUPER foi tão eficaz quanto o superfósforo, além de apresentar um efeito residual bem maior que os fosfatos solúveis. Esses experimentos demonstraram também que relações P-rocha/S entre 3:1 e 6:1 são mais adequadas e que a granulação dos componentes deve situar-se entre 0.2 e 2 mm (23, 24).

Embora a solubilização de fosfatos esteja normalmente ligada à produção de ácidos, outros mecanismos também podem estar envolvidos. Em condições redutoras - solos alagados, por exemplo - o ferro contido em fosfatos férricos insolúveis pode ser reduzido, liberando ferro e fosfatos solúveis. O aumento da disponibilidade de fósforo em solos alagados pode explicar o fato de que o arroz cultivado sob inundação requer adições menores de fósforo que o arroz de sequeiro (1).

SOLUBILIZAÇÃO POR MICRORGANISMOS QUIMIORGANOTRÓFICOS

Para microrganismos quimiorganotróficos, a liberação de CO₂ nos processos respiratórios (com formação de H₂CO₃), bem como a produção de ácidos orgânicos no metabolismo oxidativo parecem ser os mecanismos mais prováveis para a solubilização.

Muitos ácidos orgânicos, especialmente o cítrico, oxálico, láctico e succínico possuem também poder quelante sobre cátions fixadores dos ânions fosfóricos (Figura 2).

A produção desses ácidos é decorrência de bloqueios em diversos pontos do ciclo de Krebs (Figura 3).

Bactérias e Fungos

De uma maneira geral, os fungos são mais eficientes na solubilização de fosfatos inorgânicos que as bactérias (16,26), mas estas são bastante numerosas, atingindo 10⁵ a 10⁷ bactérias solubilizadoras por grama de solo (1, 8). Entre elas, citam-se: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Erwinia*, *Xanthomonas*. O actinomiceto *Streptomyces* também é ativo solubilizador de fosfatos. Entre os fungos citam-se: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Pythium* (1, 28). Estes microrganismos podem viver em meio de cultura onde

apenas a apatita ou outra fonte de fósforo insolúvel é fornecida, assimilando o fósforo para o seu metabolismo próprio e liberando o excesso como ion ortofosfato (11).

Para detectar e isolar bactérias ou fungos solubilizadores de fosfatos, basta observar, em meio de cultura onde apenas o fosfato insolúvel tenha sido fornecido como fonte de fósforo, o aparecimento de zonas claras em volta das colônias (25).

A eficiente ação solubilizadora de fosfatos naturais por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e em particular do *Aspergillus niger*, foi evidenciada por vários autores (15, 16, 26) e tem por base sua elevada capacidade em produzir ácidos oxálico, 2-cetoglucônico e outros (6, 14, 15, 16, 20, 21, 26, 29).

Com a finalidade de avaliar a ocorrência de solubilizadores sob influência direta de culturas, foram realizados isolamentos a partir de sementes, raízes e rizosfera de muitas culturas, assim como solos livres de raízes. Observou-se, então, elevada frequência de solubilizadores: 40 a 73% do total de bactérias isoladas de sementes; 4 a 19% da rizosfera; 1 a 29% de raízes e 10 a 11% dos solos livres de raízes. Os fungos solubilizadores também foram frequentes nos isolamentos: 3 a 91% em sementes; 29% na rizosfera; 2 a 32% nas raízes; e 10% nos solos livres de raízes (15). Pelos resultados pode-se observar que, em geral, a rizosfera e órgãos de plantas abrigam uma maior população de solubilizadores do que os solos livres de vegetação.

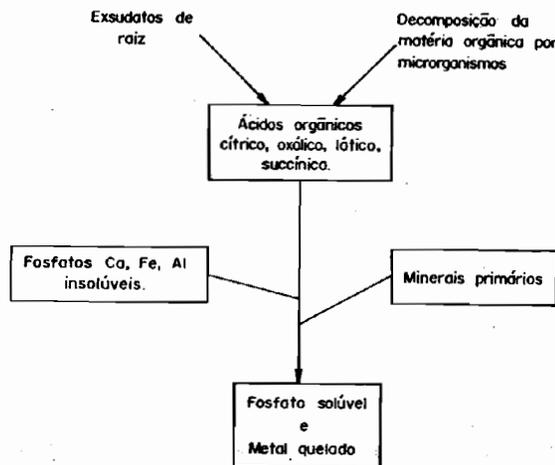


Figura 2. Ação dos ácidos orgânicos na solubilização biológica de fosfatos.

Recentemente, Kucey (16) isolou microrganismos em 70 amostras de solos cultivados no Canadá, chegando a resultados muito diferentes quanto à frequência de solubilizadores: 0,5% de bactérias solubilizadoras e 0,1% de fungos, em relação às populações totais de bactérias e fungos, respectivamente. Por outro lado, observou-se uma correlação positiva altamente significativa entre o total de fungos solubilizadores e o teor total de P nos solos.

Verificou-se, também, que as bactérias perdem a capacidade solubilizadora nos sub-cultivos in vitro (transferências sucessivas em meios artificiais), enquanto que os fungos conservam essa característica com maior facilidade (8, 16).

Na Espanha, Ramos *et alii* (26) realizaram um levantamento da ocorrência de fungos solubilizadores de fosfato bicálcico em 18 solos, observando também uma frequência elevada de solubilizadores (8 a 40% do total de fungos isolados).

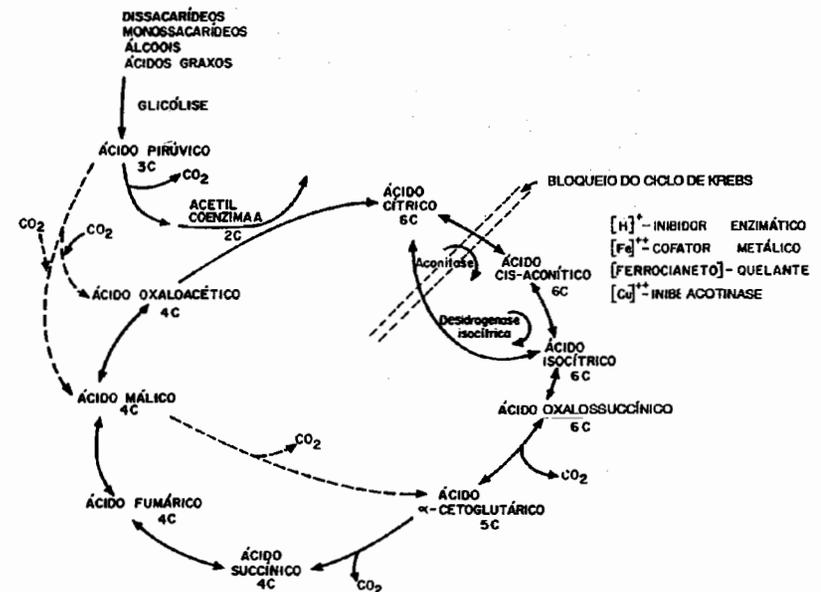


Figura 3. Metabolismo de respiração aeróbica para obtenção de energia, via ciclo de Krebs e o bloqueio do ciclo para acúmulo do ácido cítrico.

— Reações normais inerentes ao ciclo de Krebs.
 - - - Reações alternativas.

Populações Microbianas

Um estudo sobre as reações da população microbiana de diferentes solos à incorporação de fosfatos naturais insolúveis foi apresentado por Tardieux-Roche (31), que resalta algumas consequências da interação entre microrganismos e fosfatos naturais no solo: a incorporação de fosfatos naturais no solo estimula de forma global a microbiota do solo (Figura 4); houve incremento na mineralização da matéria orgânica e na síntese do húmus; a imobilização do fósforo pelos microrganismos passa a constituir-se em etapa importante, intermediária e necessária, para que o fosfato insolúvel aplicado passe lentamente à forma solúvel, mediante sua mineralização lenta e gradual subsequente; a rizosfera, em função da excreção de compostos orgânicos pelas raízes das culturas, pode representar um papel semelhante ao dos açúcares utilizados nos meios artificiais como fonte de carbono e energia.

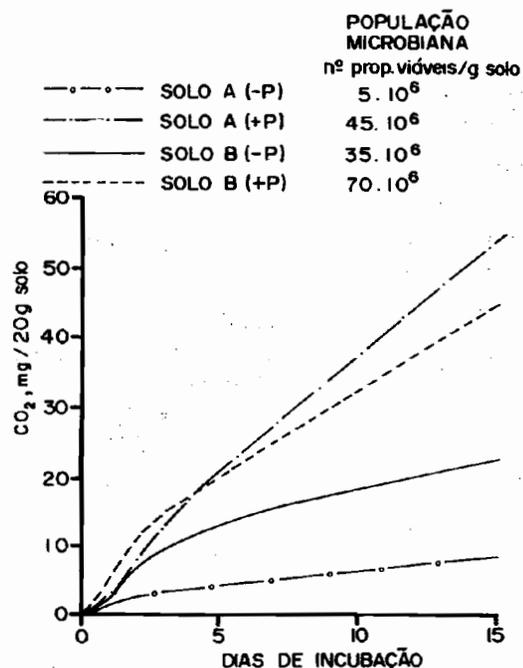


Figura 4. Efeito da incubação de dois solos com e sem hiperfosfato de Gafsa na respiração e população microbiana. Solo A: pH = 6,0; 0,49% C orgânico e 0,4mg P₂O₅/l de extrato (índice de Morgan); solo B: pH = 6,9; 0,87% C orgânico e 1,0mg P₂O₅/l de extrato (índice de Morgan) (Tardieux - Roche, 31).

Desta forma, nesses *microhabitats* próximos às raízes, o processo pode funcionar em taxas compatíveis com as necessidades da planta, ocorrendo simultaneamente a solubilização direta dos fosfatos insolúveis, imobilização/mineralização dos fosfatos orgânicos e a formação do húmus.

Fatores que afetam a Solubilização Biológica dos Fosfatos

Relação C/N - Outro fator de relevante importância nesse processo é a relação C/N. Adições de glicose e sulfato de amônio num solo podzólico vermelho-amarelo incubado com apatita de Araxá, de modo a se obter relações C/N diversas, demonstraram que altas relações C/N propiciam não só uma solubilização mais rápida da rocha, mas também a manutenção de níveis elevados de P solúvel por um tempo maior (7). Trabalhos realizados posteriormente (dados não publicados) confirmaram essas observações para outros solos, conforme pode ser observado na figura 5.

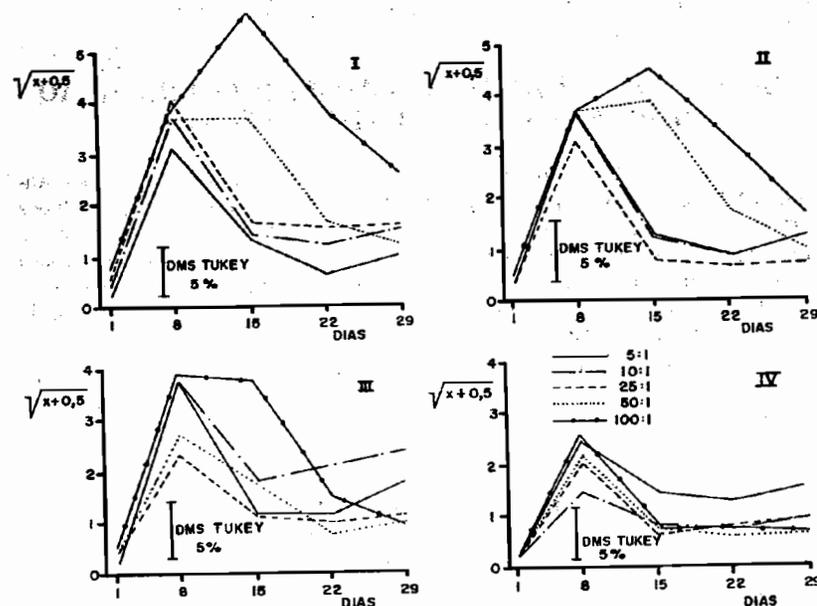


Figura 5. Solubilização do hiperfosfato de Gafsa em função da relação C/N (5:1; 10:1; 25:1; 50:1 e 100:1) e do tipo de solo (I = regossolo, II = latossolo vermelho-escuro, III = latossolo roxo e IV = terra roxa estruturada). As fontes de carbono (energia) e nitrogênio, foram, respectivamente, glicose e (NH₄)₂SO₄.

Matéria Orgânica - A aplicação simultânea de adubos orgânicos (esterco bovino) e fosfato de rocha, em cultura de trigo plantada após compostagem dessa mistura no solo, durante 15 semanas, mostrou que o P assimilado pela cultura ocorre em nível superior àquele obtido na incorporação separada desses fatores (32). Nessas condições, a eficiência agrônômica do fosfato de rocha foi equivalente à do superfosfato, enquanto que, na ausência de matéria orgânica, a eficiência agrônômica do fosfato de rocha é muito inferior à do superfosfato.

Cobertura Vegetal e Associações Micorrízicas - A rizosfera estimula o crescimento de microrganismos quimiorganotróficos, em particular o da população solubilizadora de fosfatos, através da excreção radicular de compostos orgânicos, utilizados pela população microbiana como fontes primárias de carbono e energia. Este assunto encontra-se mais detalhado no capítulo 4.

O fator mais marcante e talvez melhor estudado, capaz de incrementar a absorção de íons fosfato pelas raízes, é resultante do estabelecimento de associações micorrízicas, particularmente as micorrizas vesículo-arbusculares, em muitas culturas de interesse econômico (ver capítulos 19 e 20).

PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO BIOLÓGICA DE FOSFATOS NATURAIS

A exploração agrícola intensiva, visando suprir a demanda alimentar de zonas urbanas industrializadas, induziu a utilização maciça de adubos fosfáticos solúveis concentrados, tais como, os superfosfatos. Como consequência, subestimou-se e relegou-se por longo tempo a possibilidade prática do uso da ação biológica como fator principal ou coadjuvante de incremento do fósforo disponível às culturas, via mineralização de compostos orgânicos fosfáticos e via solubilização biológica de fosfatos inorgânicos insolúveis.

Nessa situação, os fosfatos naturais poderiam ser empregados diretamente no campo, desde que aliados a fatores biológicos para estimular sua solubilização na medida das necessidades da planta.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. 4.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1977. 472p.
2. ASSUMPÇÃO, E. Ação da população microbiana natural de um regossolo do Estado de São Paulo, influenciada pela adição de uma fonte de matéria orgânica sobre um fosfato natural. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1981, 39p. (Dissertação de Mestrado).

3. CARVALHO, P.C.T.; EIRA, A.F. & PELLEGRINO, D. Solubilização quantitativa de fosfatos insolúveis, por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 26:173-185, 1969.
4. CARVALHO, P.C.T.; SALGADO, J.M. & SANTANA, E.P. Biotransformação da apatita de Araxá em solo suplementado com diferentes fontes de carbono. *O Solo*, Piracicaba, 69(1):30-34, 1977.
5. COSGROVE, D.J. Microbial transformation in the phosphorus cycle. In: ALEXANDER, M., ed., *Advances in Microbial Ecology*. New York, Plenum Press, 1977, 95-134 p.
6. CURRIE, J.N. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 31(1):15-37, 1917.
7. EIRA, A.F. & CARVALHO, P.C.T. de. Determinação da influência da relação C/N, na solubilização da apatita de Araxá, pela microflora do solo. 51ª Reunião Anual, Seção Regional da Sociedade Botânica do Brasil, Piracicaba, 1969, 2 fl. (mimeo).
8. EIRA, A.F. & CARVALHO, P.C.T. de. Levantamento de microrganismos solubilizadores de fosfato. *Rickia*, São Paulo, 5:114-124, 1970.
9. FRIDMAN, S.V. Lixiviação: uma alternativa para minérios de baixo teor. *Brasil Mineral*, 2:20-21, 1984.
10. GERRETSEN, F.C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by plants. *Pl. Soil*, Hague, 1:51-81, 1949.
11. HAYMAN, D.S. Phosphorus cycling by soil microorganism and plant roots. In: WALKER, N., ed. *Soil Microbiology, a Critical Review*. London, Butterworth Scientific, 67-91, 1975.
12. HERLIHY, A.T. & MILLS, A.L. Sulfate reduction in freshwater sediments receiving acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 49(1):179-186, 1985.
13. INGVOSEN, K.; ZEIKUS, J.G. & BROCK, T.D. Dynamics of bacterial sulfate reduction in an eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 42(6):1029-1036, 1981.
14. KAROW, E.O. & WAKSMAN, S.A. Production of citric acid in submerged culture. *Ind. Eng. Chem.*, Washington, 39(7):821-825, 1947.
15. KATZNELSON, H.; PETERSON, E.A. & ROUATT, J.W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 40(9):1181-1186, 1962.
16. KUCEY, R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.*, Ottawa, 63:671-678, 1983.

17. LOMBARDI, M.L.C.O.; LOPES, E.S.; CARDOSO, E.J.B.N. & SILVA, M.T.R. Eficiência da dissolução de três fosfatos naturais no solo, pela atividade microbiológica de oxidação do enxofre elementar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 18., Salvador, 1981. Resumos. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1981. p.38.
18. MACHADO, J.O.; PICCINI, C.R.; BARBOSA, J.C. & NAHAS, E. Ação de vinhaça e fosfato natural sobre a população de bactérias solubilizadoras de fosfato bicálcico, habitantes da rizosfera de *Lycopersicon esculentum* (Mill) cv. "Petomech". Científica, Jaboticabal, 11(1):63-69, 1983.
19. MERZARI, A.H. Transformaciones microbiologicas de los compuestos del fosforo. IV Global Impacts of Applied Microbiology, São Paulo, 1:592-542, 1973.
20. ORTUNO, A.; HERNANDEZ, A.; NOGUEIRA, J.; MORALES, V. & ARMERO, T. Accion solubilizadora del fosforo por *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol. Espan., Madrid, 30-31:113-120, 1978.
21. ORTUNO, A.; NOGUEIRA, J.; HERNANDEZ, A. & ARMERO, T. Metabolismo fosfórico de *Aspergillus niger* en suelos calizos y salinos. Microbiol. Espan, Madrid, 30-31:101-112, 1978.
22. RAGHU, K. & MacRAE, I.C. Occurrence of phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bact., London, 29:582-586, 1966.
23. RAJAN, S.S.S. Effect of sulphur content of phosphate rock sulphur granules on the availability of phosphate to plants. Fert. Res., Hague, 4:287-296, 1983.
24. RAJAN, S.S.S. Rotokawa sulphur granules - a greenhouse study. New Zeland J. Agric. Res., Wellington, 26:233-236, 1983.
25. RAMOS, A. & CALLAO, V. El empleo de la solubilizacion de fosfato en placa como tecnica diferencial bacteriana. Microbiol. Espan., Madrid, 20:1-12, 1967.
26. RAMOS, A.; CALLAO, V. & CARVALHO, P.C.T. de. La solubilizacion de fosfatos por hongos del suelo. Microbiol. Espan., Madrid, 21:23-37, 1968.
27. SPERBERG, J.I. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Aust. J. Agric. Res., Victoria, 9:782-789, 1958.
28. SUBBA RAO, N.S. Phosphate solubilization by soil microorganisms. In: SUBBA RAO, N.S. ed., Advances in Agricultural Microbiology, London, Butterworth Scientific, 1982 p. 295-303.
29. SUBBA RAO, N.S. & BAJPAI, P.D. Fungi on the surface of legume root nodules and phosphate solubilizations. Experientia, 21:386-387, 1965.
30. SWABY, R.J. Biosuper-biological superphosphate. In: McLACHLAN, K.D., ed., Sulphur in Australasian Agriculture, Sydney Univ. Press, Sydney, 1975 p. 213-220.

31. TARDIEUX-ROCHE, A. Contribution a l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. Paris, Faculté des Sciences L'Université de Paris, 1966, 132 p. [Thèses pour le Grade Docteur - Sciences Naturelles]
32. TOMAR, N.K.; KHANNA, S.S. & GUPTA, A.P. Evaluation of Mussorie rock phosphate for wheat. Indian J. Agric. Sci., New Delhi, 53(5):330-6, 1983.
33. TUOVINEN, O.H.; HILTUNEN, P. & VUORINEN, A. Solubilization of phosphate, uranium, and iron from apatite and uranium containing rock samples in synthetic and microbiologically produced acid lach solutions. Eur. J. Appl. Microbiol. Biot. 17:327-33, 1983.
34. WAKSMAN, S. A. Soil Microbiology. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1963, 356p.

MICORRIZAS

Adriana P.D. Silveira⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

A micorriza é uma associação mutualística, na qual as raízes das plantas vasculares são invadidas por fungos específicos, ocorrendo uma perfeita integração morfológica e funcional entre os simbiosites. Trata-se de uma simbiose praticamente universal, não só pelo grande número de plantas suscetíveis à micorrização, como também por sua ocorrência generalizada na maioria dos *habitats* naturais (6).

Os fungos formadores de micorriza são habitantes comuns do solo e, colonizando as raízes, estabelecem uma série de inter-relações biotróficas: a planta fornece substrato energético ao fungo, e este, através da rede de hifas externas, capta nutrientes da solução do solo e os transfere à planta hospedeira. Tais associações são tão frequentes, que plantas não micorrizadas constituem uma exceção na natureza, o que implica dizer que as plantas não possuem raízes, mas sim micorrizas (30). Portanto, esta simbiose desempenha um papel importante na evolução e sobrevivência das plantas e contribui, de forma efetiva, para a produção vegetal.

Com base nas características morfológicas e anatômicas, diferentes tipos de micorrizas podem ser agrupados em três grandes grupos: ectomicorriza, endomicorriza e ectendomicorriza (Quadro 1).

Nas ectomicorrizas, a raiz do hospedeiro é recoberta externamente por um manto espesso de hifas, e a penetração do micélio interno no córtex da raiz é sempre intercelular, formando a chamada rede de Hartig (Capítulo 21).

⁽¹⁾ Seção de Microbiologia do Solo, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Caixa Postal 28, CEP 13.001, Campinas, S.P.

As endomicorrizas caracterizam-se pela ausência do manto de hifas ao redor das raízes, mas com penetração inter e intracelular do micélio interno nas células do córtex. São representadas por três tipos distintos:

a) **Ericóide** - micorriza formada por espécies dos gêneros: *Calluna*, *Rhododendron*, *Erica* e *Vaccinium* da família Ericaceae. As células corticais e epidérmicas das raízes muito finas são invadidas quase que totalmente pela hifa fúngica formando pelotões. Até o momento, o único endófito reconhecido como formador de micorriza ericóide é o ascomiceto *Pezizella ericae*, apesar de haver evidências de que outros fungos também o façam (25).

b) **Orquidóide** - considerada como uma das mais complexas interações simbióticas, onde o balanço dinâmico entre os simbiontes permite que o fungo invada progressivamente o tecido da planta, enquanto esta faz uso dos metabólitos fúngicos, de forma parcial ou total. Uma quebra nesse balanço

Quadro 1. Principais características dos diferentes tipos de micorriza

| | Ectomicrorriza | Endomicorrizas | | | Ectendomicorriza | Arbutóide | Monotrópicoide |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------|------------------|-----------|----------------|
| | | Vesículo arbuscular | Ericóide | Orquidóide | | | |
| Hifa intercelular | + | + | + | + | + | + | |
| Hifa intracelular | - | + | + | + | + | + | |
| Presença de manto fúngico | + | - | - | - | ou + | + | |
| Rede de Hartig | + | - | - | - | + | + | |
| Formação de pelotões | - | + | + | + | + | - | |
| Presença de arbúsculos | - | + | - | - | - | - | |
| Presença de vesículas | - | + (-) | - | - | - | - | |
| Alteração na morfologia da raiz | + | - | - | - | + | + | |
| Fungo septado | + | - | + | + | + | + | |
| Fungo não septado | (+) | + | - | - | - | - | |
| Taxon do fungo | Basídio Asco Zygo | Zygo | Asco (Basídio) | Basídio | Basídio Asco? | Basídio | Basídio |
| Hospedeiro | Gymno Angio | Bryo Pterido Gymno Angio | Ericales | Orchidaceae | Gymno Angio | Ericales | Monotropaceae |

+ : presente, - : ausente.

acarreta a eliminação da micorriza ou a mudança da relação para parasitismo. A plântula de orquídea é totalmente dependente do fungo micorrizico, que, invadindo o córtex da raiz, intracelularmente, fornece carboidratos e minerais à planta (78). Os fungos envolvidos são principalmente do gênero *Rhizoctonia* e basidiomicetos, tais como *Armillaria*, *Marasmius* e *Fomes*.

c) **Vesículo-arbuscular (VA)** - de ocorrência praticamente universal nas mais variadas ordens e famílias de plantas superiores e inferiores, de forma generalizada no ambiente terrestre (30). Nesta, a penetração do fungo ocorre intra e intercelularmente no córtex da raiz, havendo formação de estruturas típicas: vesículas e arbúsculos (Figura 1).

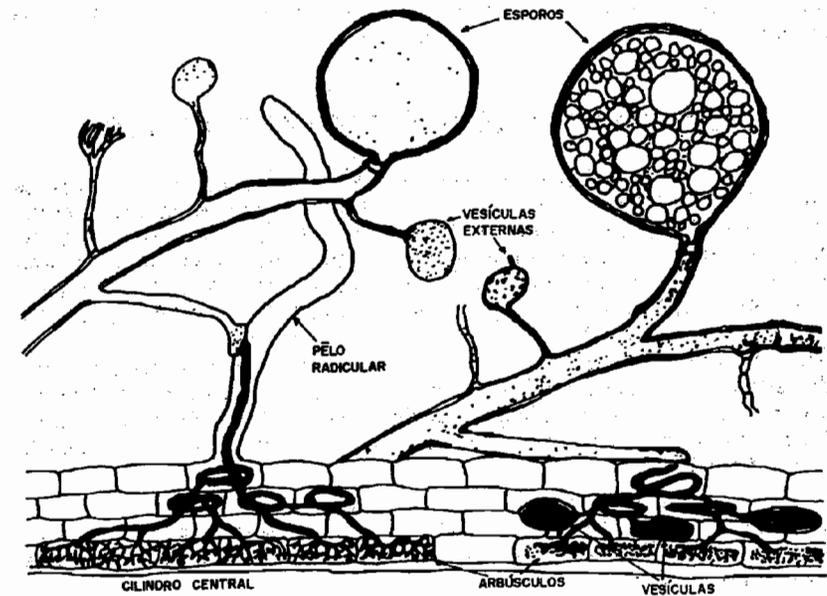


Figura 1. Aspecto geral de uma micorriza vesículo-arbuscular (Nicolson (51)).

A ectendomicorriza é uma forma de transição entre a ecto e a endomicorriza. As raízes da planta hospedeira são recobertas externamente pelo manto de hifas, que pode ser reduzido ou mesmo ausente, a rede de Hartig é bem desenvolvida e a penetração do micélio é intra e intercelular. A micorriza *Mono-*

tropóide possui um manto fúngico bem desenvolvido e ocorre em membros aclorofilados da sub-família Monotropoideae da família Ericaceae, envolvendo basidiomicetos do gênero *Boletus*. Já a micorriza *Arbutóide* possui manto, hifa externa e uma rede de Hartig bem desenvolvida, sendo que a penetração intracelular forma intensa infecção na forma de pelotões. Ocorre em espécies da família Pyrolaceae e Ericaceae, tendo como microssimbionte, fungos que, em geral, formam ectomicorrizas como *Amanita*, *Cortinarius* e *Boletus* (25, 35).

Na natureza, ainda se observa que certas plantas nunca, ou raramente, formam associações micorrízicas, podendo ocorrer o crescimento de hifas do fungo micorrízico na superfície da planta, mas não a sua penetração. Por outro lado, também há plantas que podem apresentar mais de uma forma de micorriza, como o *Eucalyptus* spp, *Populus* spp, carvalho e outras árvores que formam, ao mesmo tempo, ecto e endomicorriza.

ENDOMICORRIZA VESÍCULO-ARBUSCULAR

A micorriza vesículo-arbuscular (MVA) é a mais comum entre as micorrizas, ocorrendo, principalmente, nas culturas de importância econômica. No emprego de tais associações, têm despertado grande interesse as constatações de que a simbiose: aumenta a absorção de nutrientes, em especial o fósforo; é mais eficiente em solos de baixa fertilidade, a exemplo dos solos tropicais; aumenta a eficiência da adubação fosfática, permitindo o uso de fosfatos de baixa solubilidade; e atua como agente de controle biológico de doenças e pragas. Apesar disso, a possibilidade de sua utilização mais imediata se restringe à recuperação de áreas degradadas ou inoculação comercial de culturas que passam por uma fase em viveiro. Isso ocorre pelo fato de que a produção de inoculantes dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares é ainda deficiente, pois estes não são cultiváveis em meio artificial.

A adequação das práticas agrícolas, buscando um manejo da associação que lhe propicie expressar todo seu potencial, é objetivo final da pesquisa sobre a MVA, o que, sem dúvida, reverterá em benefícios significativos para a agricultura.

MORFOLOGIA E FORMAÇÃO DA MVA

MVA resulta da colonização de raízes finas das plantas por fungos do solo pertencentes à família Endogonaceae. A penetração do fungo se restringe ao córtex da raiz não atingindo a endoderme. As raízes micorrizadas não são distinguidas das não micorrizadas pela simples observação macroscópica, porque não ocorre alteração morfológica da raiz, embora em algumas plantas (por exem-

plo, cebola e milho), a raiz possa apresentar uma cor amarelada nas regiões fortemente infectadas. É formada, basicamente, por três componentes: as raízes hospedeiras, as hifas do fungo no interior das raízes e as hifas externas que se desenvolvem para além da rizosfera. O processo de formação da MVA (Figura 2) pode ser dividido em cinco fases (7).

ATIVAÇÃO DOS PROPÁGULOS DO FUNGO

Existem no solo três tipos de propágulos que, apesar de diferirem quanto à capacidade de sobrevivência e potencial infectivo, são formas de inóculo capazes de originar a simbiose.

Esporos de resistência - podem persistir no solo por períodos longos, germinando quando as condições se mostram favoráveis. Estes esporos passam por um período de repouso, que pode durar várias semanas em solo úmido, mas que é abreviado em solo seco. Fatores desconhecidos do solo estimulam a germinação de esporos, enquanto que outros, como manganês (37), alumínio (69), ion cloreto e sódio (38), podem desempenhar um papel fungistático. O pH e a temperatura são também importantes, sendo que as espécies, em geral, germinam melhor em condições semelhantes àquelas de onde foram isoladas (62).

Fragmentos de raiz micorrizada - há evidências de que a infecção por pedaços de raiz obtidos de plantas micorrizadas é mais rápida do que por esporos (56). A viabilidade deste tipo de inóculo depende da idade e da capacidade metabólica do fragmento de raiz, bem como da presença de vesículas intra-radiculares.

Hifas do fungo - o solo pode conter uma quantidade apreciável de micélio que, possuindo capacidade infectiva, é também capaz de colonizar a raiz. Apesar de possuírem um limitado crescimento no solo, independente da raiz, sua sobrevivência é mantida em presença da matéria orgânica do solo, que atua como substrato na ausência do hospedeiro (48).

CRESCIMENTO DO FUNGO ATÉ A RAIZ E AÇÃO DA RIZOSFERA

Apesar de ainda haver dúvidas a respeito do efeito da rizosfera no direcionamento inicial da hifa, já é reconhecido o seu papel em estimular o crescimento do fungo, quando encontra a raiz de um hospedeiro (56). A causa desse estímulo rizosférico deve-se, provavelmente, aos exsudatos radiculares, que agiriam diretamente sobre o micélio do fungo ou alterariam a permeabilidade da membrana das células radiculares, facilitando a penetração da hifa. Além disso, é possível que microrganismos habitantes da rizosfera também afetem o desenvolvimento do fungo.

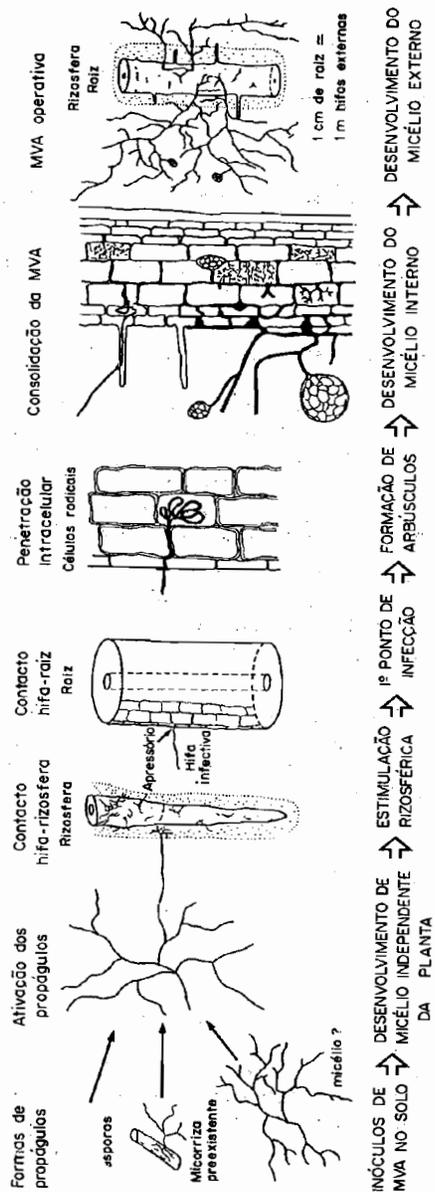


Figura 2. Sequência dos eventos no processo de formação de uma micorriza vesículo-arbuscular (MVA). (Barea et al., (7).

PENETRAÇÃO DA HIFA E INÍCIO DA INFECÇÃO

Ao contactar a raiz de um hospedeiro suscetível, o fungo pode formar um apressório e penetrar imediatamente, ou ter um crescimento micelial na superfície radicular antes de infectá-la (36), dependendo do tipo de propágulo. O fungo não penetra por lugares danificados da raiz e nem onde o córtex está partido pela emergência de uma raiz lateral, indicando que necessita de um sítio fisiologicamente funcional para a penetração. Uma vez ocorrido o primeiro ponto de entrada, a raiz torna-se mais suscetível à formação de novos pontos de infecção (58).

DESENVOLVIMENTO DA FASE INTRA-RADICAL OU COLONIZAÇÃO DA RAIZ

O crescimento do micélio dentro da raiz restringe-se ao córtex, e as ramificações das hifas ocorrem inter e intracelularmente. Hifas intracelulares, freqüentemente colonizam as camadas mais externas do córtex, enquanto as hifas intercelulares ocorrem nas camadas intermediárias do córtex (11).

A distância percorrida pela hifa no interior da raiz, a partir de um ponto de entrada, denomina-se unidade de infecção, o qual pode oscilar desde 0.5 até vários centímetros (7). A região colonizada da raiz não apresenta um aspecto contínuo, e tanto a velocidade de propagação como o nível de infecção dependem da combinação hospedeiro-endófito (36).

Poucos dias após o início da infecção, a hifa intracelular da camada mais interna do córtex sofre repetidas divisões dicotômicas, formando um sistema complexo de hifas ramificadas, chamado de *arbúsculo*. Os arbúsculos envolvidos por uma plasmalema intacta do hospedeiro são os sítios preferenciais de intercâmbio de metabólitos entre os simbioses, com alta atividade fisiológica. São bastante vacuolados, encontrando-se grande concentração de grânulos de polifosfatos, grânulos de glicogênio e de lipídios. As células invadidas sofrem transformações, desaparece o amido e os núcleos aumentam de tamanho, podendo até ocorrer divisão nuclear. Arbúsculos têm período funcional entre 4 a 15 dias e, com sua degeneração, a célula hospedeira recupera a atividade normal.

As hifas intra-radiciais também se diferenciam em *vesículas*, que são estruturas ovais ou arredondadas, ocupando posição terminal ou intercalar na hifa. Podem ser inter ou intracelulares e ocupam as camadas internas e externas do córtex. Possuem a parede fina, que, no entanto, pode, às vezes, se espessar, transformando-se em clamidosporos. As vesículas, em geral, são produzidas em regiões mais antigas da infecção e são consideradas estruturas de armazenamento do fungo, contendo grande quantidade de lipídios. Pelo fato de o número de vesículas freqüentemente aumentar em raízes velhas ou mortas, sugere-se que também desempenham um papel como órgãos de repouso e de

propagação do fungo (11). Estas vesículas internas são produzidas por todos os fungos formadores de MVA, com exceção dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*.

DESENVOLVIMENTO DO MICÉLIO EXTERNO

Simultaneamente à propagação intra-radical do fungo, as hifas de penetração se ramificam exteriormente. O micélio externo desempenha um importante papel no sistema micorrízico, porque constitui uma estrutura de absorção adicional da raiz, capacitando a planta para obter nutrientes, que, de outra forma, não lhe seriam acessíveis.

O desenvolvimento e a propagação da hifa externa depende, principalmente, do tipo de solo, do hospedeiro e do fungo. O micélio externo liga-se ao micélio intra-radical, podendo haver correlação entre a sua quantidade e a taxa de colonização da raiz (72).

No micélio externo podem ser formadas células auxiliares isoladas ou agrupadas, cuja função ainda não se conhece, e grandes esporos de resistência de parede espessa. Estes esporos podem sobreviver no solo por meses, e talvez até por anos (48), e sua germinação reinicia um novo ciclo da simbiose.

OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO

A maioria das plantas, desde as Briófitas e Pteridófitas até as Gimnospermas e Angiospermas forma MVA, a qual ocorre em praticamente todas as famílias de plantas, com exceção daquelas exclusivamente ectomicorrízicas, Pinaceae e Cupuliferae, ou das que possuem associações específicas como as Ericales e Orquidaceae. Também não formam MVA as famílias Commelinaceae, Cyperaceae e Juncaceae das monocotiledóneas, e várias famílias das dicotiledóneas como, Brassicaceae, Fumariaceae e Urticaceae. Por outro lado, é encontrada na maior parte das espécies importantes para a agricultura, principalmente as que ocorrem nas famílias Solanaceae, Gramineae e Leguminosae.

No Brasil, já há um número considerável de relatos de ocorrência e efeito da MVA em diversas culturas, como café (5, 14, 19, 40, 67), citros (17), sorgo (47), milho (28), feijão (59, 64, 65), soja (15, 16, 53, 68), videira (27), seringueira (12, 41), plantas ornamentais (33, 66, 76), forrageiras tropicais (42, 55), cana-de-açúcar (3, 4), cacau (26) e outras. Essa associação é encontrada em todo ambiente terrestre, desde as regiões polares até os trópicos. Apesar disso, observa-se que endófitos que predominam em determinada área podem não estar presentes em outras. Inúmeros são os trabalhos de levantamento, que vêm sendo realizados em muitas partes do mundo (48). Tais observações também já foram realizadas em diferentes ecossistemas brasileiros, como floresta tropical (29, 71), cerrado (13) e dunas e restinga (75).

O FUNGO MICORRÍZICO

Os fungos formadores de MVA pertencem à classe dos Zygomycetes, ordem Endogonales e família Endogonaceae. O gênero tipo da família, *Endogone*, contém espécies que formam ectomicorrizas ou são saprófitas, e, portanto, não está incluído entre os formadores de MVA, os quais pertencem aos gêneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora* e *Gigaspora*, identificados pelas características e modo de formação dos esporos. (Quadro 2, Figura 3).

Quadro 2. Principais diferenças entre os gêneros de fungos formadores de MVA

| Características | <i>Glomus</i> | <i>Sclerocystis</i> | <i>Acaulospora</i> | <i>Entrophospora</i> | <i>Gigaspora</i> | <i>Scutellospora</i> |
|---------------------------------|---------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| Produz clamidosporo | + | + | - | - | - | - |
| Produz azigosporo | - | - | + | + | + | + |
| Esporos ectocárpicos | + | - | + | + | + | + |
| Esporos em esporocarpo | + | + | - | - | - | - |
| Hifa de sustentação persistente | + | - | - | - | + | + |
| Presença de bulbo | - | - | - | - | + | + |
| Formação de sáculo esporífero | - | - | + | + | - | - |
| Produção de células auxiliares | - | - | - | - | + | + |

+ : presente, - : ausente.

Glomus Tul. & Tul. forma clamidosporos ectocárpicos isolados ou em esporocarpos, em hifa de sustentação reta ou afunilada, a qual permanece ligada ao esporo na maturidade.

Sclerocystis Berk. & Br. produz clamidosporos dispostos lado a lado numa só camada que se irradia de um plexo hifálico central, em esporocarpo.

Acaulospora Gerd. & Trap. forma azigosporos ectocárpicos, produzidos lateralmente sobre o pedúnculo de uma grande vesícula terminal, chamada de sáculo esporífero (77), a qual se separa do esporo maduro.

Entrophospora Ames & Schn. forma azigosporos ectocárpicos, que são produzidos no interior do sáculo esporífero, o qual se esvazia para formar o esporo logo abaixo, na mesma hifa de sustentação.

Gigaspora Gerd. & Trap. distingue-se por produzir azigosporos ectocárpicos, que se formam terminal ou lateralmente sobre uma hifa, a qual se dilata em uma célula bulbosa suspensora (bulbo). Os esporos são de estrutura

relativamente simples e possuem um único grupo de paredes, através do qual o tubo germinativo emerge.

Scutellospora Walker & Sanders também forma azigosporos ectocárpicos sobre uma célula bulbosa suspensora. Os esporos possuem uma estrutura

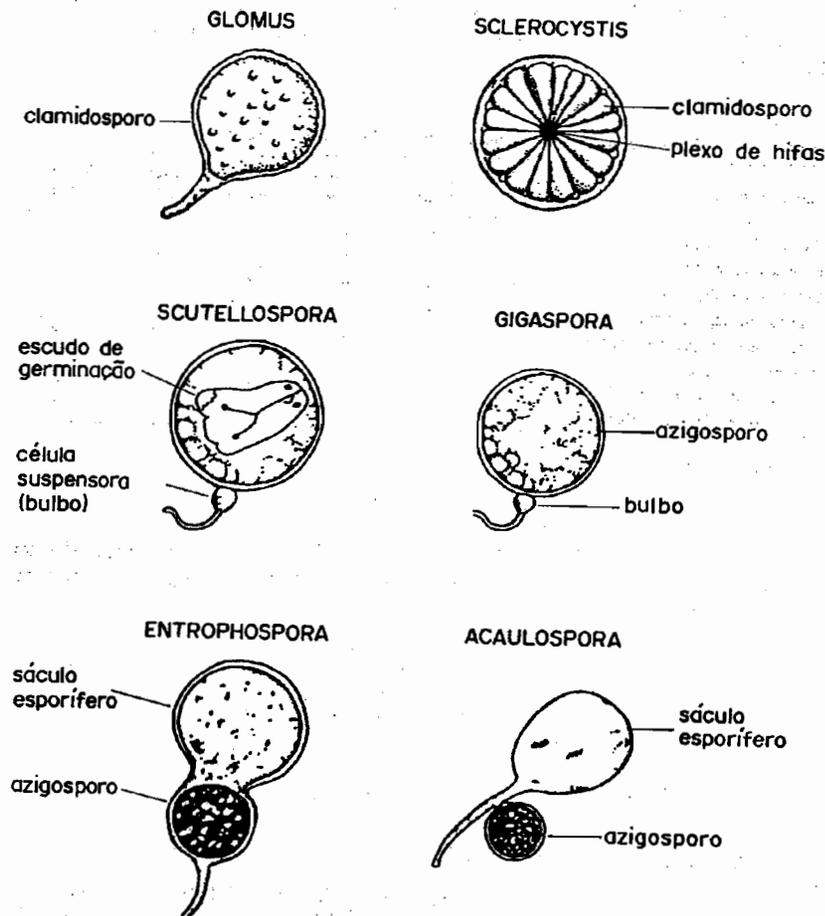


Figura 3. Esquema dos esporos dos gêneros de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (60).

de parede complexa, e o tubo germinativo emerge de uma estrutura denominada escudo de germinação.

O fato de esses fungos não serem ainda cultivados *in vitro* torna difícil sua identificação e classificação, acarretando dúvidas sobre a verdadeira posição sistemática de alguns. A classificação a nível de espécie é baseada em características como: ausência ou presença de esporocarpo, tamanho e forma do esporo, cor e aparência em água sob microscópio de dissecação, forma e comprimento da hifa de sustentação, natureza da ornamentação da parede, estrutura e espessura da parede e outros (77). Para a identificação desses fungos existem chaves a nível de espécie, tais como de Trappe (74), Hall (34), Schenck e Pérez (60).

EFEITO DA MICORRIZA VESÍCULO-ARBUSCULAR

Os efeitos benéficos da MVA têm sido repetidamente demonstrados nas mais variadas condições e espécies vegetais. Paralelamente, tem-se desviado grande atenção para os processos fisiológicos envolvidos, na tentativa de esclarecer os mecanismos responsáveis pelos efeitos da simbiose sobre o crescimento e nutrição da planta.

EFEITO NO CRESCIMENTO DA PLANTA

A micorriza, na maioria dos casos, estimula o crescimento vegetal, como uma consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral da planta, principalmente no aumento da absorção de fósforo. A simbiose não só aumenta a biomassa vegetal, como também influencia a proporção na qual esta se distribui entre a parte aérea e a raiz. O estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação destes à parte aérea causa, relativamente, menor transferência de fotossintatos à raiz e maior retenção deles na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde. Como consequência, a relação peso da matéria seca da parte aérea/peso da matéria seca da raiz é, em geral, mais elevada em plantas micorrizadas.

Em algumas condições, entretanto, observam-se efeitos negativos da micorriza. Nesse caso pode ocorrer depressão no crescimento da planta, pois o fungo passa a se comportar como parasita, provavelmente em consequência de: - competição entre planta e fungo por fotossintatos nos estágios iniciais da infecção; - condições sub-ótimas para fotossíntese quanto à intensidade e qualidade luminosa, temperatura, etc.; - concentrações supra-ótimas de fósforo nos tecidos vegetais; - grande disponibilidade de fósforo no substrato (70).

EFEITO SOBRE A ABSORÇÃO DE NUTRIENTES

Absorção de fósforo

O fósforo é, indubitavelmente, o mais importante nutriente envolvido na resposta de crescimento das plantas micorrizadas (58, 72). Trabalhos empregando o radioisótopo ^{32}P demonstraram que, assim como as raízes, as micorrizas também usam fósforo da fração solúvel (disponível) do solo. O processo de transporte de fosfato da solução do solo à planta, mediado pela MVA, divide-se em três fases, conforme representado na Figura 4.

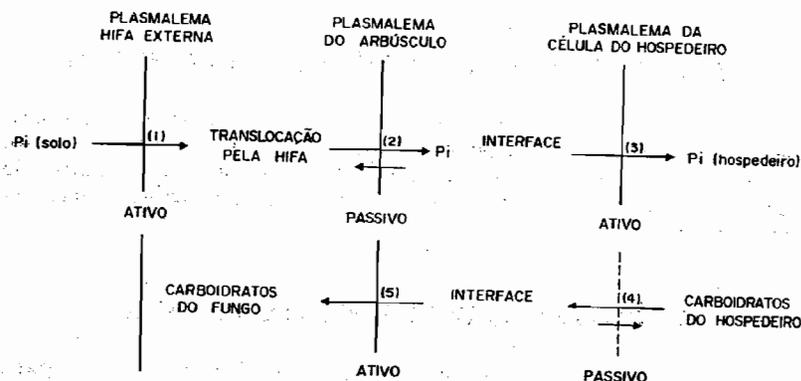


Figura 4. Mecanismo proposto para o transporte de fosfato (Pi) e carboidrato em uma MVA. (1) Capturação do Pi do solo por um sistema de transporte ativo, na plasmalema da hifa externa; (2) Translocação de Pi pela hifa por um sistema de transporte passivo até a plasmalema do arbúsculo; (3) Transferência de Pi para o hospedeiro, através de um sistema de transporte ativo; (4) Sistema de transporte passivo de carboidrato no hospedeiro até a plasmalema da célula; (5) Transferência de carboidrato do hospedeiro para o fungo, através de um sistema de transporte ativo (Woolhouse (79)).

FASE 1 - Captação do fosfato pelo micélio externo: a velocidade de captação do íon é função da velocidade com que este chega à superfície da raiz, o que depende, por sua vez, da mobilidade e concentração na solução do solo. No caso dos íons fosfatos, sua concentração na solução edáfica é de 10^{-6} M e sua difusão é muito lenta, além do fato de sofrerem, freqüentemente, o processo de fixação ou precipitação com cálcio, ferro ou alumínio (10). Uma vez alcançada a rizosfera, as raízes absorvem o fosfato a uma velocidade superior à sua liberação para a solução do solo, formando uma zona de depleção de fósforo (1 - 2 mm) ao redor da raiz. As hifas do fungo micorrízico são capazes de crescer e se ramificar para além da zona

de depleção, chegando a alcançar 8 cm de distância da superfície da raiz (58). Portanto, a MVA atua por um mecanismo físico, proporcionando à raiz um aumento no número de sítios de absorção de fósforo, ao mesmo tempo que explora um maior volume de solo (72). Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos, como demonstram os estudos de cinética de absorção de fósforo (22, 63). Raízes micorrizadas possuem um sistema de absorção mais eficiente que raízes não micorrizadas, caracterizado por alta V_{max} e baixo K_m , principalmente em plantas crescendo com baixa concentração de fósforo disponível. Acrescente-se ainda o fato de que uma raiz, quando associada ao fungo micorrízico, mantém-se funcional durante mais tempo (36).

FASE 2 - Translocação do fosfato: este processo ocorre através das estruturas intra-radiciais do fungo, na forma de grânulos de polifosfato, impulsionados por correntes citoplasmáticas nas hifas até os arbúsculos, ocorrendo também fluxo de massa (21).

Na formação dos grânulos de polifosfato parece haver atuação de polifosfatoquinases específicas nas hifas externas, enquanto que na degradação de tais grânulos atuam fosfatases alcalinas específicas da MVA (31). Estas se concentram nos vacúolos, principalmente dos arbúsculos, com um máximo de atividade na fase em que a formação deles também é máxima. Na micorriza, essas enzimas atuam por um mecanismo de auto-regulação, sendo inibidas com o aumento na concentração de fosfato.

FASE 3 - Transferência de fosfato: o principal sítio de transferência de fosfato do fungo às células do córtex é o arbúsculo. É um mecanismo ativo realizado através da plasmalema (44), que foi verificado pela presença de atividade de ATP-ase em células com arbúsculo. A degeneração do arbúsculo também libera seu conteúdo no interior da célula, mas este mecanismo contribui pouco. Nas micorrizas que não formam arbúsculos, a transferência ocorre através das hifas intercelulares.

Absorção de outros nutrientes

Para os nutrientes de maior mobilidade no solo, como nitrato e sulfato, a contribuição extra das hifas do fungo micorrízico para sua absorção é muito limitada. A maior participação da simbiose está na absorção de íons que se difundem lentamente no solo.

Plantas micorrizadas, no geral, apresentam maior absorção de nutrientes, em especial Zn, Cu, Ca e S, podendo, no entanto, serem encontrados resultados conflitantes (Quadro 3). Observa-se, ainda, que pode ocorrer troca de nutrientes entre plantas crescendo em proximidade, mediada por hifas do fungo, ligadas a mais de um hospedeiro ao mesmo tempo (50), o que é importante em consorciação de culturas. No caso do nitrogênio, foi demonstrado que pode haver absorção e translocação do NH_4^+ pelas hifas do fungo (2).

Quadro 3. Alguns resultados mostrando o efeito da MVA na concentração de elementos na matéria seca de diversas plantas⁽¹⁾

| Plantas | N | P | K | Ca | Mg | S | Fe | Cu | Mn | Zn | B | Al | Na |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Maçã | ... | + | + | ... | ... | ... | + | + | - | ... | ... | ... | ... |
| Milho | ... | + | - | ... | - | ... | ... | ... | - | ... | - | ... | ... |
| Morango | ... | ... | - | ... | + | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| Pêssego | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | + | ... | ... | ... |
| Soja | + | + | 0 | + | 0 | ... | 0 | + | + | ... | ... | ... | ... |
| Soja | + | + | 0 | + | 0 | ... | 0 | - | 0 | ... | ... | ... | ... |
| Videira | ... | + | + | - | - | ... | ... | - | - | ... | - | - | - |
| Citros | ... | + | - | - | - | ... | - | 0 | - | 0 | 0 | - | - |
| Várias hospedeiras | ... | ... | - | ... | + | ... | ... | + | + | + | ... | ... | ... |
| Citros | ... | ... | ... | ... | ... | ... | + | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| Soja | ... | ... | - | - | - | ... | ... | ... | 0 | 0 | ... | ... | ... |
| Alfafa | + | ... | + | - | - | ... | ... | ... | ... | + | ... | ... | ... |
| Alfafa | ... | + | 0 | - | - | ... | + | + | 0 | + | ... | ... | ... |
| Citros | ... | + | + | - | - | ... | - | + | 0 | + | ... | ... | ... |
| Caupi | - | 0 | - | 0 | 0 | ... | ... | ... | 0 | 0 | ... | ... | ... |
| Soja | + | + | - | 0 | - | 0 | + | 0 | - | + | + | + | 0 |

(1) +: Aumento da concentração em planta micorrizada; -: Diminuição da concentração em planta micorrizada; 0: Concentração equivalente em planta micorrizada e não micorrizada; ...: Dados desconhecidos. (Extraído de diversos trabalhos, citados em Cardoso (16)).

Diminuição no teor de manganês e alumínio em planta micorrizada sugere que, talvez, a simbiose desempenhe algum papel de proteção direta da planta à toxicidade desses elementos e/ou esteja envolvida no caráter de tolerância da planta a eles (15, 42).

EFEITO NA RELAÇÃO ÁGUA-PLANTA

Sob condições de baixa umidade e baixa concentração de fósforo, as plantas micorrizadas são mais tolerantes ao estresse de água. As plantas em simbiose recuperam-se mais rapidamente do murchamento e usam a água absorvida mais eficientemente. Parece que os mecanismos envolvidos na maior tolerância das plantas micorrizadas à seca dizem respeito a alterações no nível nutricional e hormonal do hospedeiro.

EFEITOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS

Apesar de a MVA não causar alteração na morfologia da raiz, podem ocorrer modificações anatômicas e histoquímicas, tais como: aumento no

teúdo vascular da planta, o que facilita a translocação de água e nutrientes; lignificação do xilema e células corticais; aumento na quantidade de grãos de amido na célula, na espessura das folhas e no número de células do mesófilo e plastídios.

Além disso, a colonização das plantas por fungos micorrízicos ainda resulta em modificações fisiológicas causadas pela produção de hormônios, como ácido abscísico, giberelinas e citoquininas, cujas atividades têm sido maiores em plantas micorrizadas (1). Já foram observados, nessas associações, incrementos no teor, ou até mesmo o aparecimento de vários ácidos graxos, lipídios e fitosteróis, além de composição diferencial de aminoácidos (49).

EFEITO NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂

Fungos micorrízicos aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas e, portanto, favorecem a fixação do N₂, cujo processo exige elevada quantidade de fósforo e molibdênio, principalmente. Leguminosas com dupla simbiose (*Rhizobium* e MVA) mostram maior nodulação, atividade da nitrogenase, concentração de leg-hemoglobina e teor de nitrogênio (9, 18, 64, 65).

EFEITO SOBRE FITOPATÓGENOS

A interação entre a MVA e fungos fitopatogênicos do solo tem revelado que plantas micorrizadas, em geral, apresentam menores danos que as não micorrizadas, como resultado da diminuição na incidência da doença ou pela inibição do desenvolvimento do patógeno. Entretanto, alguns relatos têm mostrado um aumento na severidade da doença em plantas colonizadas por fungos micorrízicos (80), indicando que plantas micorrizadas, apesar de mais desenvolvidas e nutridas, podem ser mais suscetíveis a certos patógenos (23, 45).

No caso das interações positivas envolvendo tais fungos e nematóides, pode ocorrer decréscimo na taxa de penetração e no desenvolvimento e reprodução do nematóide na raiz e nos danos causados à planta.

Os mecanismos de ação envolvidos no aumento de tolerância da planta micorrizada a patógenos parecem estar relacionados: a alteração na qualidade e quantidade de nutrientes na rizosfera; à produção de aminoácidos e açúcares redutores; às alterações na fisiologia das raízes e aumento de espessura da parede de células corticais; à competição física por espaço na raiz; ao estímulo da população rizosférica antagonista; à maior lignificação das raízes, e à maior absorção de nutrientes pela micorriza, principalmente fósforo, o que lhe confere maior vigor e crescimento (80, 81).

O efeito protetor da micorriza contra fitopatógenos do solo ocorre quando ambos os microrganismos estão simultaneamente presentes na rizosfera ou na raiz da planta, sendo que a pré-colonização da raiz pelo fungo micorrízico garante uma proteção mais eficiente.

Com relação a doenças causadas por bactérias, vírus e fungos de parte aérea, a presença da micorriza aumenta a severidade da doença e a taxa de reprodução do patógeno, provavelmente, devido ao melhor estado nutricional da planta em simbiose.

EFEITO NA ESTRUTURA DO SOLO

As hifas externas dos fungos em simbiose participam na agregação de partículas do solo, principalmente grãos de areia, como foi observado em dunas. Além disso, agem na estabilização dos agregados, ocorrendo deposição de material amorfo entre as partículas de areia e as hifas (73).

FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO E FUNÇÃO DA MVA

A presença de uma planta suscetível e a existência de propágulos do fungo no solo são as condições básicas para ocorrer a micorrização. Entretanto, a infectividade do fungo micorrízico e a eficiência da simbiose estabelecida são afetadas por vários fatores.

FATORES QUÍMICOS DO SOLO

Os nutrientes do solo, especialmente nitrogênio e fósforo, influem na MVA, afetando, principalmente, o estabelecimento da simbiose.

Maior taxa de colonização radicular e efeito micotrófico ocorrem em solos com baixa disponibilidade de fósforo (Figura 5), diminuindo com o aumento do fósforo disponível (17, 65). O mecanismo pelo qual altos níveis de fósforo podem inibir a penetração e colonização das raízes pelos fungos micorrízicos ainda não está esclarecido. Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar esse efeito: a) fosfatases acumuladas nas raízes, em condições de baixo nível de fósforo, formariam dímeros com lectinas, as quais estariam bloqueando a penetração do fungo (79); b) baixo suprimento de fósforo reduziria a síntese de fosfolipídios, tornando as células mais permeáveis, havendo maior exsudação de aminoácidos e açúcares na rizosfera, o que estimularia a colonização da raiz (32,

57); c) maior disponibilidade de fósforo no solo aumenta a concentração de açúcares nas células corticais, o que desfavoreceria a penetração do fungo e colonização (32).

Altos níveis de nitrogênio podem afetar negativamente o estabelecimento da micorriza, sendo que a forma amoniacal é mais inibitória do que a nítrica.

O pH do solo afeta a associação micorrízica, seja por seus efeitos diretos sobre a permeabilidade das membranas do fungo e da planta, seja pelos efeitos indiretos na disponibilidade dos nutrientes. Fungos micorrízicos têm sido encontrados em solos com pH variando de 2,7 a 9,2, ocorrendo, entretanto, diferenças entre as espécies e isolados de fungos quanto à capacidade de germinar e colonizar o hospedeiro em função do pH do solo (42, 69). Em solos ácidos, o alumínio tóxico parece ser o principal fator fungistático sobre a associação. Devido a isso, o efeito da calagem do solo sobre a MVA é, em geral, positivo.

A salinidade do solo também influi na simbiose, sendo que sódio e cloro podem reduzir a germinação de esporos.

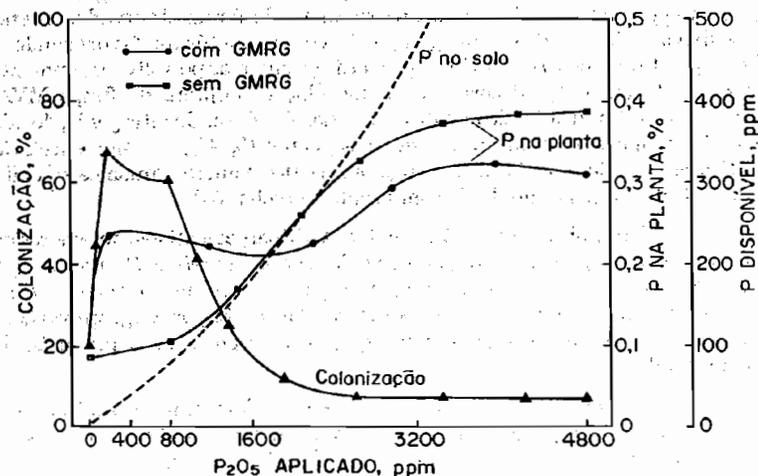


Figura 5. Efeito da aplicação de fósforo na taxa de colonização radicular, teores de fósforo na parte aérea de plantas com e sem *Gigaspora margarita* (GMRG) e fósforo disponível no solo (Siqueira & Colozzi-Filho (67)).

FATORES FÍSICOS

A umidade, temperatura, luminosidade e aeração afetam diretamente o fungo micorrízico ou indiretamente a associação, pela interferência no desenvolvimento do hospedeiro. Apesar de relatos de ocorrência de MVA em ambientes aquáticos e em zona árida, a umidade do solo interfere na germinação de esporos, na colonização de raízes e esporulação dos fungos, havendo um efeito mais negativo em condições de excesso de umidade. A aeração do solo afeta a simbiose desde a germinação do esporo, uma vez que os fungos são aeróbios, até o estabelecimento e efeito da associação.

O efeito da temperatura depende da espécie de fungo e da combinação fungo-hospedeiro, alterando a germinação de esporos, a colonização da raiz, formação de arbúsculos e vesículas, a eficiência da simbiose e a esporulação do fungo (61). Existe acentuado efeito da interação dos fatores luz e temperatura sobre a micorriza, uma vez que podem afetar o vigor do hospedeiro e, portanto, a disponibilidade de carboidratos para o fungo, alterando o equilíbrio da simbiose.

FATORES BIOLÓGICOS

Diferentes tipos de interação podem ocorrer entre fungos micorrízicos e outras populações microbianas da rizosfera. Já foram observadas interações positivas, de caráter sinérgico, tais como: bactérias favorecendo o estabelecimento da micorriza devido à produção de enzimas pectolíticas; aumento na resposta da micorriza decorrente da inoculação conjunta de fungo MVA, microrganismo solubilizador de fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio, devido à produção de hormônios ou fatores de crescimento (6, 43); e maior eficiência simbiótica pela dupla inoculação de fungo micorrízico e microrganismos solubilizadores de fosfato em solo adubado com fosfato de rocha (54).

Exemplo de interação negativa é o hiperparasitismo de esporos de fungo micorrízico por outros fungos, como *Rhizidiomycopsis* e *Humicola*, que podem, sob certas condições, diminuir a população de fungos micorrízicos no solo. Além disso, patógenos de raiz podem reduzir a colonização por fungo micorrízico devido à competição, entre ambos, por espaço e nutrientes ou à produção de fitoalexinas (39).

Presença de nematóides micófagos podem reduzir o micélio e o número de esporos. Entretanto, a presença de pequenos mamíferos, minhocas, insetos e pássaros favorece a dispersão dos fungos micorrízicos.

AGROTÓXICOS

A maioria dos pesticidas age inibindo o estabelecimento da MVA (46). A fumigação do solo reduz o número de esporos e inibe a infecção. Os

fumigantes mais tóxicos para a MVA são cloropicrina, formaldeído, milone, brometo de metila, vapam e vorlex. Por outro lado, alguns nematicidas podem aumentar a incidência da associação. Os fungicidas sistêmicos inibem a MVA, agindo não apenas nas estruturas externas do fungo, mas podendo também eliminá-lo dentro dos tecidos colonizados. Já os fungicidas não sistêmicos podem ser menos prejudiciais, se usados em doses normais. Os herbicidas possuem efeito variável, e muitos deles parecem não afetá-la. Há relatos de que alguns inseticidas inibem a micorrização (52).

MANEJO DO SOLO E CULTURA

O manejo das culturas, a rotação e o emprego de plantas hospedeiras e não hospedeiras podem afetar a densidade de propágulos do fungo, bem como a capacidade infectiva do solo. O emprego de fertilizantes químicos e orgânicos afeta a população de fungos micorrízicos no solo, enquanto que rotações de cultura podem alterar a quantidade e qualidade de esporos, em função das preferências existentes entre os simbiosistas.

Solos erodidos e de áreas de mineração são praticamente desprovidos de propágulos de fungo micorrízico. A introdução de tais fungos seria altamente benéfica para o processo de recuperação dessas áreas depauperadas.

FATORES INERENTES À PLANTA E AO FUNGO

Apesar de a resposta da planta à condição micorrízica ser afetada por vários fatores externos, a dependência da simbiose é uma característica inerente à própria planta. A dependência micorrízica, definida como o grau em que a planta depende da condição de estar micorrizada para apresentar crescimento máximo a um dado nível de fertilidade do solo (30) é variável com a espécie e até mesmo com a variedade considerada. Assim, uma planta que possui maior dificuldade em captar o fósforo da solução do solo, ou que seja mais exigente em fósforo, obtém maior benefício da MVA, isto é, é mais dependente da simbiose. Apesar de a suscetibilidade da planta à micorrização ser controlada geneticamente, Baylis (8) aponta que a morfologia e a geometria do sistema radicular são determinantes do grau de micotrofismo da planta. Aquelas cujas raízes são desprovidas de pêlos radiculares ou em que estes são curtos e escassos apresentam maior dependência.

Outro fator considerado é a espécie ou o isolado de fungo micorrízico. Apesar de não haver especificidade, o grau de compatibilidade fungo-planta parece estar relacionado a mecanismos de reconhecimento entre o fungo e a planta hospedeira (24).

TRANSFERÊNCIA DE CARBONO EM MVA

O fornecimento de carbono ao fungo em simbiose é feito pela transferência direta de compostos fotossintetizados do hospedeiro, através dos arbúsculos. Assim, os fatores que influem na fotossíntese do hospedeiro, como intensidade luminosa, fotoperíodo e desfolhamento, podem alterar tal fornecimento, causando desbalanço na simbiose. O mecanismo de transferência e a forma de carbono transferida ainda não foram elucidados. Contudo, as evidências sugerem um sistema ativo de transferência de carboidrato (Figura 4), encontrando-se este na forma de sacarose. Na MVA, o material de reserva se acumula essencialmente como lipídio, podendo também ocorrer acúmulo de glicogênio nas hifas (20).

LITERATURA CITADA

1. ALLEN, M.F.; MOORE JR., T.S. & CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin like substances and abscisic acid in the host plant. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 60:468-471, 1982.
2. AMES, R.N.; READ, C.P.P.; PORTER, D.R. & CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N - labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, Oxford, 95:381-396, 1983.
3. ANDREOLA, F. Micorrizas vesículo-arbusculares em cana-de-açúcar. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1982. 74 p. (Dissertação de Mestrado).
4. ANDREOLA, F.; CARDOSO, E.J.B.N. & SILVEIRA, A.P.D. Efeito de seis espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares sobre o desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar. *STAB*, Piracicaba, 7:35-37, 1985.
5. ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café (*Coffea arabica* L.). Turrialba, San José, 38:117-122, 1988.
6. ÁZCON - AGUILAR, C. & BAREA, J.M. Micorrizas. *Investigacion y Ciencia*, Madrid, 47:8-16, 1980.
7. BAREA, J.M.; ÁZCON-AGUILAR, C. & ROLDAN-FAJARDO, B. Avances recientes in el estudio de la micorriza VA. I. Formacion, Funcionamiento y efectos in nutricion vegetal. *An. Edafol. Agrobiol.*, Madrid, 659-677, 1985.
8. BAYLIS, G.T.S. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p. 409-417.
9. BETHLENFALVAY, G.J. & YODER, J.F. The *Glycine - Glomus - Rhizobium* symbiosis. 1- Phosphorus effect on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. *Physiol Plant.*, Copenhagen, 52:141-145, 1981.
10. BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Palo Alto, 24:225-252, 1973.
11. BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, D.LI. & BAGYARAJ, D.I., eds. *VA Mycorrhiza*. Florida, CRC Press, Inc., 1984, p. 5-33.
12. BONONI, V.L.R. & BARBOSA, L.M. Micorriza em seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arq.). Reunión Brasileira sobre Micorrizas, 1., Lavras, 1985. p. 144.
13. BONONI, V.L.R. & TRUFEM, S.F.B. Endomycorrizas vesículo-arbusculares do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, São Paulo. *Rickia*, São Paulo, 10:55-84, 1983.
14. CARDOSO, E.J.B.N. Ocorrência de micorriza em café. *Summa Phytopathol.*, Piracicaba, 4:136-137, 1978.
15. CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato de rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 9:125-130, 1985.
16. CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:17-24, 1986.
17. CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. da & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:25-30, 1986.
18. CARLING, D.E.; RIEHLE, W.G.; BROWN, M.F. & JOHNSON, D.R. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating soybeans. *Phytopathology*, St. Paul, 68:1590-1596, 1978.
19. COLOZZI-FILHO, A. & SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. I. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:199-206, 1986.
20. COOPER, K.M. Physiology of VA mycorrhizal association: In: POWELL, C. LI. & BAGYARAJ, D.J., eds. *VA Mycorrhiza*. Florida, CRC Press, Inc., 1984. p. 155-186.
21. COOPER, K.M. & TINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorus. *New Phytol.*, Oxford, 88:327-339, 1981.
22. CRESS, W.A., THRONEBERRY, G.O. & LINDSEY, D.L. Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol.*, Lancaster, 64:484-487, 1979.

23. DEHNE, H.W. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 72:1115-1119, 1982.
24. DUDRIDGE, J.A. Specificity and recognition in mycorrhizal associations. In: GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S., eds. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Proc. of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, 1986. p 45-58.
25. ENGLANDER, L. Endomycorrhizae by septate fungi. In: SCHENCK, N.C., ed., *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, 1982. p. 11-13.
26. EZETA, F.N. & SANTOS, O.M. Importância da endomicorriza na nutrição mineral do cacauzeiro. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 5:22-27, 1981.
27. FERNANDES, F.A. & LOPES, E.S. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA) em videira, na região de Jundiá, SP. *Reunião Brasileira sobre Micorrizas*, 1., Lavras, 1985. p. 151.
28. FERNANDEZ, A.B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L. & GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11:101-108, 1987.
29. FERRAZ, J.M.G. Levantamento de micorriza vesículo-arbuscular em culturas da Amazônia. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 3:194-196, 1979.
30. GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and plant growth. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 6:397-418, 1968.
31. GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol. Plant Pathol.*, New York, 12:45-53, 1978.
32. GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T. & MENGE, J.A. Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol*, Lancaster, 68:548-552, 1981.
33. GRANDI, R.A.P.; TRUFEM, S.F.B. & KOMESU, S.T. Fungos micorrízicos (Endogonaceae) em quatro espécies de Marantaceae. *Reunião Brasileira sobre Micorrizas*, 2., São Paulo, 1987. p. 1.
34. HALL, I.R. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. In POWELL, C. Ll. & BAGYARAJ, D.J., eds. *VA mycorrhiza*. Florida, CRC Press, 1984. p. 57-94.
35. HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. *Mycorrhizal symbiosis*. London, Academic Press, 1983. 483 p.
36. HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular and arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can J. Bot.*, Ottawa, 61:944-963, 1983.

37. HEPPEL, C.M. & SMITH, G.A. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 66:189-194, 1976.
38. HIRREL, M.C. The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia*, New York, 73:610-617, 1981.
39. LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O. & ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 7:1-19, 1983.
40. LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M. & MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 7:137-142, 1983.
41. MAIA, L.C. & TRUFEM, S.F.B. Espécies de Endogonaceae associadas à seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), no Estado de Pernambuco. *Reunião Brasileira sobre Micorrizas*, 1., Lavras, 1985. p. 158.
42. MALUF, A.M.; SILVEIRA, A.P.D. da & MELO, I.S. Influência da calagem e da micorriza vesículo-arbuscular no desenvolvimento de cultivares de leucena tolerante e intolerante ao alumínio. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 12:17-24, 1988.
43. MANJUNATH, A.; MORAN, R. & BAGYARAJ, D.J. Interaction between *Beijerinckia mobilis*, *Aspergillus niger* and *Glomus fasciculatum* and their effects on growth of onion. *New Phytol.*, Oxford, 85:723-727, 1981.
44. MARX, C.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATP-ase) for active transfer process in the host arbuscule interface. *New Phytol.*, Oxford, 90:37-43, 1982.
45. MELO, I.S.; COSTA, C.P. & SILVEIRA, A.P.D. Influência de micorrizas vesículo-arbusculares sobre a Murcha de berinjela causada por *Verticillium albo-atrum* Reinke e Berth. *Summa Phytopathologica*, Piracicabá, 11:173-179, 1985.
46. MENGE, J.A.; JOHNSON, E.L.V. & MINASSIAN, V. Effect of heat treatment and three pesticides upon the growth and reproduction of the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus*. *New Phytol.*, Oxford, 82:473-480, 1979.
47. MIRANDA, J.C.C.; SOUZA, D.M.G. de & MIRANDA, L.N. Influência de fungos endomicorrízicos vesículo-arbusculares na absorção de fósforo e no rendimento de matéria seca de plantas de sorgo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 8:31-36, 1984.
48. MOSSE, B. *Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Research for Tropical Agriculture*. Hawaii, Inst. for Tropical Agric. and Human Resources, 1981. 82 p. (Research Bulletin 194).
49. NEMEC, S. & MEREDITH, F.I. Amino acid content of leaves in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus root stocks. *Ann. Bot.*, London, 47:351-358, 1981.

50. NEWMANN, F.I. & RITZ, K. Evidence on the pathways of phosphorus transfer between vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.*, Oxford, 104:77-87, 1986.
51. NICOLSON, T.H. Vesicular-arbuscular mycorrhiza - a universal plant symbiosis. *Sci. Prog.*, London, 55:561-581, 1967.
52. OCAMPO, J.A. Micorrizas VA. II. Efecto sobre el crecimiento de las plantas. *An. Edafol. Agrobiol.*, Madrid, 39:1049-1069, 1980.
53. PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H. & OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 12:25-32, 1988.
54. PAULINO, V.T. & ÂZCON, R. Respostas de *Centrosema pubescens* Benth. à inoculação de micorriza vesículo-arbuscular e microrganismos solubilizadores de fosfato em meio com fosfato de rocha. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11:263-268, 1987.
55. PAULINO, V.T.; PICCINI, D.F. & BAREA, J.M. Influência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em leguminosas forrageiras tropicais. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:103-108, 1986.
56. POWELL, C. Ll. Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 66:439-445, 1976.
57. RATNAYAKE, M.; LEONARD, R.T. & MENGE, J.A. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol.*, Oxford, 81:543-552, 1978.
58. RHODES, L.H. & GERDEMANN, J.W. Nutrient translocation in vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: COOKS, P.W.; PAPPAS, P.W. & RUDOLPH, E.D., eds. *Cellular Interactions in symbiosis and Parasitism*. Columbus, Ohio State Univ. Press, 1980. p. 173-195.
59. SAITO, S.M.T.; MARTINS, E.C.S.; FREITAS, J.R. de & ROSTON, A.J. Ocorrência natural de micorriza e *Rhizobium phaseoli* em áreas com feijoeiro. *Pesq. agrop. bras.*, Brasília, 18:855-861, 1983.
60. SCHENCK, N.C. & PÉREZ, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. INVAM, Florida, 1987. 245 p.
61. SCHENCK, N.C. & SCHRODER, V.N. Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. *Mycologia*, New York, 66:600-605, 1974.
62. SCHENCK, N.C.; GRAHAM, S.O. & GREEN, N.E. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, New York, 67:1189-1192, 1975.
63. SILVEIRA, A.P.D. Cinética da absorção de fósforo e estado nutricional de feijoeiro sob influência de micorriza vesículo-arbuscular. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1990. 130p. (Tese de Doutorado).

64. SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Influência do tipo de solo e do fungo micorrízico vesículo-arbuscular no desenvolvimento de três cultivares de feijão. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11:37-44, 1987.
65. SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Efeito do fósforo e da micorriza vesículo-arbuscular na simbiose *Rhizobium*-feijoeiro. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11:31-36, 1987.
66. SILVEIRA, A.P.D. da & LIMA, A.M.L. Influência de diferentes espécies de fungo micorrízico vesículo-arbuscular no desenvolvimento do crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*). Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 1., Lavras, 1985. p. 19.
67. SIQUEIRA, J.O. & COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:207-212, 1986.
68. SIQUEIRA, J.O. & PAULA, M.A. Efeito de micorrizas vesículo-arbusculares na nutrição e aproveitamento de fósforo pela soja em solo sob cerrado. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:97-102, 1986.
69. SIQUEIRA, J.O.; MAHMUD, D.W. & HUBBELL, D.M. Comportamento diferenciado de fungos formadores de micorrizas vesicular-arbusculares em relação à acidez do solo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:11-16, 1986.
70. SMITH, S.E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol. Rev.*, London, 55:475-510, 1980.
71. ST. JOHN, T.V. Root size, root hairs and mycorrhizal infection: a re-examination of Baylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytol.*, Oxford, 84:483-487, 1980.
72. TINKER, P.B. Soil chemistry of phosphorus and mycorrhizal effects on plant growth. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds., *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p. 353-372.
73. TISDALL, J.M. & OADES, J.M. Stabilization of soil aggregates by the root system of ryegrass. *Aust. J. Soil Res.*, Victoria, 17:429-441, 1979.
74. TRAPPE, J.M. Synoptic keys to the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 72:1102-1108, 1982.
75. TRUFEM, S.F.B. Micorrizas vesículo-arbusculares da Ilha do Cardoso, S.P., Brasil. São Paulo, Universidade de São Paulo. 1988. 328 p. (Tese de Doutorado).
76. TRUFEM, S.F.B.; SILVEIRA, R.B.A. & OTOMO, H.S. Fungos MVA em Roseiras, no Estado de São Paulo. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 2., São Paulo, 1987. p. 1-2.
77. WALKER, C. Identifying the endomycorrhizal Endogonaceae. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 2., São Paulo, 1987, p. 83-87.

78. WARCUP, J.H. & TALBOT, P.H.B. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol.*, Oxford, 84:207-212, 1980.
79. WOOLHOUSE, H.W. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. *In*: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p. 209-239.
80. ZAMBOLIM, L. Como plantas micorrizadas comportam-se em relação a fitopatógenos. *Reunião Brasileira sobre Micorrizas*, 1., Lavras, 1985. p. 76-99.
81. ZAMBOLIM, L. & SCHENCK, N.C. Reduction of the effects of pathogenic root infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Phytopathology*, St. Paul, 72:1402-1405, 1983.

APLICAÇÕES PRÁTICAS DE MICORRIZAS VESÍCULO-ARBUSCULARES (MVA)

Elke J.B.N. Cardoso⁽¹⁾ & Márcio R. Lambais⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

A presença generalizada das MVA nos mais diferentes ambientes é provavelmente o resultado da não especificidade entre a maioria dos fungos MVA e seus hospedeiros.

O termo especificidade é usado aqui para designar a capacidade de uma determinada espécie fúngica formar micorriza com um único hospedeiro. A especificidade entre endófito e hospedeiros que formam micorrizas só ocorre a nível de gênero ou de família. Não há nenhum caso onde uma linhagem ou mesmo uma espécie de fungo é específica para um hospedeiro em particular (20). Normalmente, fungos MVA isolados de uma planta podem formar micorrizas com um grande número de outros hospedeiros, embora a eficiência em absorver nutrientes da solução do solo e translocá-los para a parte aérea, promovendo conseqüentemente o crescimento vegetal, seja variável, dependendo da combinação fungo-hospedeiro-solo (47).

Existe uma grande variabilidade, tanto interespecífica (29,35,63), quanto intra-específica (25), no que se refere à capacidade de o endófito colonizar as raízes do hospedeiro e promover o crescimento vegetal. Às vezes, determinado isolado ou determinada população de fungos MVA possui grande capacidade de penetração e desenvolvimento na raiz do hospedeiro. No entanto, sua eficiência em absorver e translocar nutrientes para o hospedeiro pode ser bastante baixa, de modo que o balanço energético seja desfavorável à planta, consumando-se um

⁽¹⁾ Departamento de Ciência do Solo. ESALQ/USP. Caixa Postal 9, CEP 13400, Piracicaba, SP.

caso típico de parasitismo (27). Assim, o benefício ou não da formação da micorriza será determinado pela interação do genótipo do fungo com o da planta e destes com o ambiente, sendo possível um número muito grande de combinações que maximizem a produção vegetal (Quadro 1).

Quadro 1. Acúmulo relativo de fósforo e eficiência relativa das simbioses formadas com diferentes fungos MVA em três cultivares de feijoeiro, em três solos (Silveira & Cardoso (61))

| Fungos MVA ⁽¹⁾ | Terra roxa estruturada | | | Areia quartzosa | | | Latossolo Vermelho-escuro | | |
|--|------------------------|----------------|-------------|-----------------|----------------|-------------|---------------------------|----------------|-------------|
| | Carioca | Goiano-Precoce | Negro Argel | Carioca | Goiano-Precoce | Negro Argel | Carioca | Goiano-Precoce | Negro Argel |
| Acúmulo relativo de fósforo (%) | | | | | | | | | |
| G.m. | 61 | 7 | 119 | 81 | 69 | 324 | 84 | 272 | 204 |
| G.l. | 374 | 235 | 397 | 60 | 93 | 530 | 154 | 381 | 315 |
| Gi.h. | 62 | 25 | 68 | 26 | 39 | 74 | 46 | 183 | 136 |
| Gi.ma. | 226 | 138 | 219 | 115 | 4 | 267 | 100 | 221 | 141 |
| Eficiência relativa ⁽²⁾ (%) | | | | | | | | | |
| G.m. | 32 | -18 | 39 | 42 | 45 | 68 | 33 | 69 | 59 |
| G.l. | 67 | 44 | 69 | 0 | 27 | 82 | 49 | 71 | 60 |
| Gi.h. | 23 | -5 | 29 | 11 | 20 | 22 | 18 | 40 | 47 |
| Gi.ma. | 48 | 34 | 56 | 47 | -25 | 66 | 35 | 55 | 50 |

(1) Fungos MVA - G.m.: *Glomus macrocarpum*; G.l.: *Glomus leptotichum*; Gi.h.: *Gigaspora heterogama*; e Gi.ma.: *Gigaspora margarita*.

(2) Eficiência relativa (ER):

$$ER = \frac{\text{Matéria seca da planta micorrizada} - \text{Matéria seca da planta não micorrizada}}{\text{Matéria seca da planta micorrizada}} \times 100$$

SELEÇÃO DE FUNGOS MVA PARA INOCULAÇÃO

As características básicas dos fungos MVA a serem selecionados para inoculação, segundo Abbott & Robson (1), devem ser: aumento de absorção de nutrientes do solo e translocação para as plantas, além de persistência no solo. Os mesmos autores sugerem iniciar o processo de seleção pelos fungos que tenham esporos que germinem rapidamente, que tenham hifas que cresçam bem no solo e que sejam capazes de colonizar extensivamente o hospedeiro. Outras características a serem consideradas seriam: a capacidade do fungo em formar propágulos que persistam no solo por longos períodos, mesmo na ausência do hospedeiro, e sua habilidade em competir com os fungos MVA nativos e outros microrganismos. Obviamente essas características devem ser estudadas para condições edafoclimáticas definidas.

PRODUÇÃO DE INÓCULO

Por serem simbiotes obrigatórios, os fungos MVA ainda não foram cultivados *in vitro*, apesar das inúmeras tentativas em culturas axênicas e monoxênicas (14,31,44). O cultivo dos fungos MVA é feito *in vivo*, isto é, os fungos se multiplicam em plantas vivas, chamadas plantas multiplicadoras, crescendo sob condições controladas de temperatura e umidade.

Para produção de inóculo cultiva-se uma planta hospedeira em vaso contendo substrato esterilizado, inoculando-se alguns esporos do fungo MVA a ser multiplicado junto à raiz. No final do ciclo da planta, um grande número de esporos pode ser obtido, formado no substrato, a partir das hifas externas da micorriza.

In vitro, o esporo germina e o tubo germinativo cresce até um determinado momento, a partir do qual seu crescimento é paralisado. Os mecanismos bioquímicos que determinam o início do processo de germinação dos esporos e a paralisação do crescimento do tubo germinativo ainda não são conhecidos, mas muitos estudos estão sendo feitos para esclarecê-los (64).

O primeiro passo para a produção de inóculo de fungos MVA (31) é o isolamento de seus esporos do solo, através do método de peneiramento úmido (23). Os esporos são separados por espécie, baseando-se em suas características morfológicas (59), com o auxílio de um microscópio estereoscópico, e inoculados em plantas multiplicadoras. Os esporos devem ser examinados cuidadosamente e apenas aqueles livres de parasitas devem ser utilizados. A ocorrência de fungos parasitas de esporos de fungos MVA já foi amplamente relatada (18,58,56,62), e cuidados especiais devem ser tomados para não se introduzirem fitopatógenos juntamente com os esporos dos fungos MVA (13).

A obtenção de inóculo pode ser feita também a partir de segmentos de raízes colonizadas. A pureza do inóculo deve ser controlada periodicamente, para que haja maior garantia do tipo de material com que se está trabalhando.

A planta multiplicadora deve ter algumas características a serem observadas, dentre elas: ser um bom hospedeiro para o endófito a multiplicar, apresentar crescimento rápido e uma abundante produção de raízes e não possuir patógenos comuns à cultura na qual o inóculo será utilizado (43).

PRODUÇÃO DE INÓCULO EM SOLO ESTERILIZADO

O tipo de solo para a produção de inóculo é um dos fatores limitantes do processo e deve ser escolhido com muito critério. Menge (43) sugere a utilização de solos arenosos de baixa fertilidade natural. Outros tipos de substratos, como a vermiculita, perlita, turfa e casca-de-árvore, também podem

ser utilizados, atentando-se para possíveis problemas de toxidez. Dehne & Backhaus (19) utilizaram agregados leves de argila expandida juntamente com solo arenoso para a produção de inóculo de fungos MVA, com muito sucesso e com grandes facilidades de aplicação no campo.

A esterilização do substrato escolhido para produção do inóculo pode ser feita por autoclavagem (1 atm, 121^o C), por radiação gama (0,8 a 1,0 Mrad), por fumigação com biocidas do tipo brometo de metila (0,45 a 1,00 kg/m³), e por vapor flúente (83 a 100^o C), de acordo com Menge (43). Os nutrientes necessários podem ser supridos por adubação, ou através de soluções nutritivas com baixas concentrações de P e micronutrientes.

O fósforo é o nutriente mais limitante para a produção do inóculo de fungos MVA. Altas concentrações de P podem inibir o processo de colonização, da mesma forma que concentrações muito baixas podem fazer com que o fungo estabeleça uma relação parasítica com a planta (45). O nitrogênio pode ser aplicado juntamente com a água de irrigação e preferivelmente na forma de nitrato, já que o íon amônio é mais tóxico às MVA (15). Os micronutrientes também devem ser aplicados em baixas concentrações para não haver acúmulo e possíveis problemas de toxidez. Altas concentrações de Mn e Zn podem inibir a germinação dos esporos (30,32). Ojala *et alii* (1978), citados por Lambert *et alii* (36), observaram que a formação de MVA é maior em solos com baixas concentrações de Zn, Cu, Fe e Mn. Fatores como a relação água-ar do substrato, pH, luminosidade, tamanho do vaso, temperatura, poda e aplicação de pesticidas também devem ser considerados, já que podem interferir, direta ou indiretamente, nos processos de colonização e esporulação (43).

PRODUÇÃO DE INÓCULO EM HIDROPONIA

Várias técnicas de hidroponia têm sido usadas para a produção de inóculo de fungos MVA (21,34,50,53). Esse sistema consiste basicamente em cultivar as plantas inoculadas com fungos MVA em contato com soluções nutritivas, na presença ou na ausência de um substrato sólido.

A produção de inóculo em hidroponia parece ser afetada principalmente pela aeração e pela concentração de nitrogênio e fósforo na solução (43). Estes fatores devem ser otimizados para a maximização da produção de inóculo, bem como devem ser estudadas a infectividade e as condições de armazenamento desse inóculo.

INOCULAÇÃO

A introdução de fungos MVA em sistemas agrícolas pode ser feita basicamente de duas maneiras: pré-inoculando-se as mudas nos viveiros, ou distribuindo-se o inóculo no campo.

A pré-inoculação de mudas produzidas em substrato esterilizado, ou através de micropropagação, tem-se mostrado uma alternativa muito promissora, em relação ao alto custo dos fertilizantes (37,38,42). Além disso, as micorrizas VA podem alterar as relações de nutrientes no tecido vegetal, de modo que a planta tolere concentrações tóxicas de determinados nutrientes no solo (10,35).

No Brasil, a produção e o desenvolvimento de mudas de café (40,66) e de citros (5,12,66) vêm sendo muito estudados, tendo sido sugerido por Menge (42) um esquema para produção de inóculo e inoculação de viveiros (Figura 1).

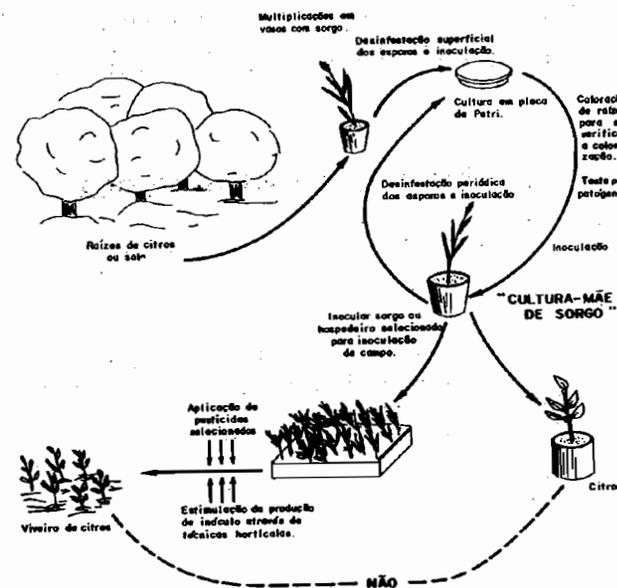


Figura 1. Esquema para produção de inóculo de fungos MVA e sua utilização em viveiros, segundo Menge (43).

Quando se pensa em distribuir o inóculo no campo, a complexidade da operação aumenta consideravelmente. Primeiramente, deve-se considerar tanto a infectividade quanto a eficiência em promover o crescimento vegetal da população nativa, em relação ao fungo introduzido (1, 11). Caso a inoculação seja recomendada, existem várias maneiras de distribuir o inoculante no solo. Hayman

et alii (28) comparam quatro métodos para inoculação em campo: distribuição a lanço das sementes e do inóculo com posterior incorporação ao solo; inóculo aplicado em sulcos aproximadamente 10 cm abaixo das sementes; inóculo obtido por peneiramento úmido e sementes pré-germinadas suspensas em metil-celulose a 4% e aplicados em sulcos por meio de um saco de polietileno com a ponta cortada; e inoculação de péletes de aproximadamente 1 cm de diâmetro com várias sementes distribuídas a lanço.

O melhor resultado foi com a aplicação do inóculo em sulcos abaixo das sementes. Baltruschat (8) adaptou uma máquina semeadora e adubadora para a aplicação de partículas de argila expandida contendo esporos de *Glomus etunicatum* e obteve bons resultados, quando o inóculo era aplicado no sulco abaixo das sementes. Sieverding & Saif (60) consideram que a aplicação do inoculante não é problemática, mesmo que este seja constituído de solo contendo propágulos de fungos MVA, desde que o inoculante possa ser produzido nas quantidades necessárias.

POTENCIAL DE USO AGRÍCOLA

O Brasil, bem como outros países da América tropical, possui uma grande área de solos extremamente lixiviados, ácidos e distróficos, como os solos sob vegetação de cerrado que ocupam uma área de aproximadamente 1,8 milhões de km² (39).

De acordo com Sieverding & Saif (60), do ponto de vista sócio-econômico essas regiões possuem pouca infra-estrutura e a produtividade agrícola é limitada pelo baixo nível de insumos utilizados. Essa limitação poderia ser superada com a utilização de tecnologia de baixo custo, como as biológicas. Os mesmos autores consideram as associações micorrízicas um componente biológico fundamental da tecnologia de baixo custo para a agricultura tropical.

Sanches & Salinas (57) sugerem seis estratégias para o manejo de oxisolos e ultissolos da América tropical, inclusive a utilização de associações micorrízicas para o melhor aproveitamento do fósforo do solo e de fertilizantes. O sucesso de tal estratégia é dependente da difusão da tecnologia de inoculação, e do sucesso na seleção de fungos adaptados a condições edafoclimáticas definidas e/ou do manejo da população nativa, além da disponibilidade de inoculante.

A produção de inoculante por pequenos agricultores, que normalmente ocupam solos ácidos e distróficos e não utilizam insumos, foi sugerida por Sieverding & Saif (60). De acordo com a esquematização do processo, mostrada na figura 2, o inóculo seria produzido no local de utilização, evitando o transporte oneroso de grandes quantidades de inóculo. Os mesmos autores fizeram uma análise da relação custo-benefício da inoculação de plantações de mandioca na

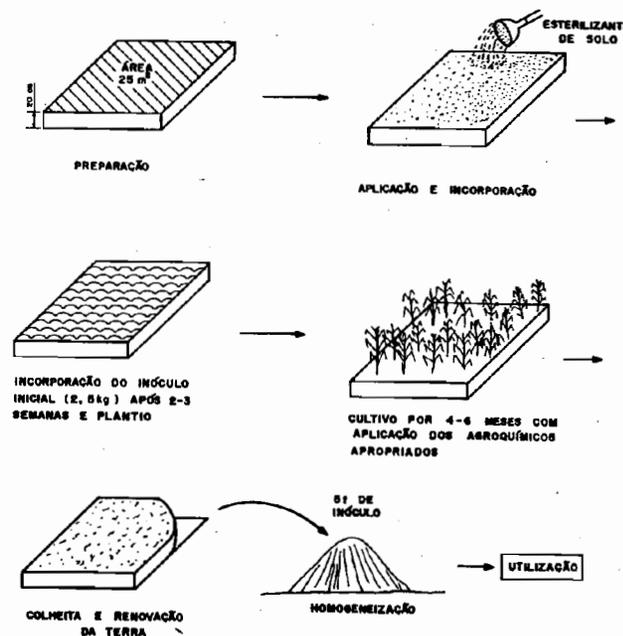


Figura 2. Modelo teórico para produção de inóculo em pequenas propriedades, segundo Sieverding & Saif (60).

Colômbia e verificaram que o lucro decorrente da aplicação dessa tecnologia é aproximadamente 1,5 vezes maior do que o custo de produção e aplicação do inóculo pelo próprio agricultor, desde que se utilize um isolado eficiente, pois a variabilidade entre diferentes isolados é muito alta (Quadro 2).

A inoculação de fungos MVA juntamente com *Rhizobium* em leguminosas, bem como a combinação desses inoculantes e adubação com rochas fosfáticas são consideradas tecnologias de baixo custo e têm mostrado resultados muito significativos para o aumento da produtividade vegetal. Assim, já em 1948, Asai (6) demonstrou que várias leguminosas cultivadas em solo esterilizado e inoculadas com *Rhizobium* somente nodulavam bem e fixavam nitrogênio ativamente, quando também eram inoculadas com pequena quantidade de solo natural. A explicação para este fato é que o solo natural continha propágulos de fungos MVA, os quais invadiam as raízes das leguminosas, formando micorrizas. Posteriormente, o fato de que a leguminosa micorrizada nodula melhor e fixa mais

Quadro 2. Efeito da inoculação de mandioca com diferentes isolados de fungos MVA na produção de matéria seca da parte aérea e absorção de P (Sieverding & Saif, 60)

| Código do isolado | Matéria seca da parte aérea | | Absorção de fósforo |
|-------------------|-----------------------------|--|---------------------|
| | g/planta | | mg/planta |
| NM ⁽¹⁾ | 0,21 | | 0,22 |
| MAN | 4,16 | | 3,58 |
| LON | 1,24 | | 1,62 |
| COL | 5,54 | | 4,82 |
| LON | 5,22 | | 4,32 |
| OCC | 5,47 | | 5,95 |
| APP | 6,04 | | 5,59 |
| MOR | 0,59 | | 1,03 |
| MIC | 2,60 | | 3,58 |
| MAR | 2,84 | | 3,18 |

(1) NM: plantas não micorrizadas. As outras letras são códigos de diferentes espécies de fungos MVA, não identificados pelos autores.

nitrogênio, especialmente em solos com baixos teores de fósforo, foi confirmado por inúmeros autores (10,16,17,48,61).

Em geral, a explicação para o sinergismo que ocorre entre o *Rhizobium* e a micorriza nas leguminosas está relacionada com a maior absorção do P e de outros nutrientes por leguminosas micorrizadas, propiciando, portanto, uma maior nodulação (ver capítulo 16 sobre os fatores limitantes à fixação do N₂). Além dessa explicação poderá ainda haver o efeito hormonal e modificador da fisiologia vegetal pela micorriza, que foi observado em diversas plantas (2,3,26,33,51,52). Também já foram relatadas respostas sinérgicas à inoculação de uma mesma planta com fungo MVA juntamente com bactérias fixadoras de N₂ de vida livre e/ou com bactérias e fungos solubilizadores de fosfatos (7, 41).

O melhor aproveitamento de fosfatos naturais por plantas micorrizadas, mesmo na ausência de solubilizadores de fósforo, tem sido repetidamente reportado (4, 5, 10, 11, 22, 49, 54, 55, 65). No início, esses resultados levaram à hipótese de que a micorriza tem a capacidade de solubilizar fosfatos. Verificou-se, entretanto, que essa hipótese era errônea (46,24). A melhor explicação para o efeito favorável da micorriza no aproveitamento de fosfatos naturais pelas plantas reside no fato de que as hifas da micorriza exploram muito maior volume de solo, exercendo uma força de dreno sobre os íons de fósforo solúveis (solubilizados através de ação química ou biológica no solo), deslocando o equilíbrio entre íons solúveis e precipitados no sentido de maior solubilização. Isso corresponde a dizer que qualquer íon de P solubilizado é imediatamente absorvido pela hifa e transportado para a planta, antes que ocorra a possibilidade de uma reprecipitação (p.

ex., com íons de Al ou Fe livres na solução do solo). O esquema da figura 3 esclarece tal atividade da micorriza, de acordo com Barea & Azcon-Aguilar (9).

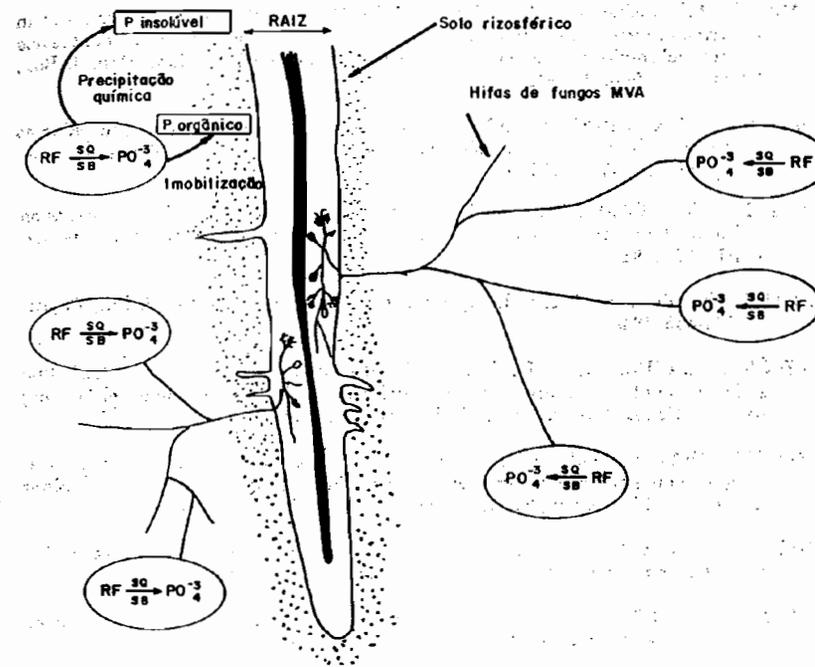


Figura 3. Participação das micorrizas VA no melhor aproveitamento de rochas fosfáticas, de acordo com Barea & Azcon-Aguilar (9), modificado.

RF = Rocha fosfática SQ = Solubilização química SB = Solubilização biológica

Em conclusão, fica evidente que a inoculação de fungos MVA e as práticas de manejo específicas podem levar a aumentos de produção e economia de insumos agrícolas.

LITERATURA CITADA

1. ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. Aust. J. Agric. Res., Victoria, 33:339-408, 1982.

2. ALLEN, M.F.; MOORE, Jr, T.S. & CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increase in the host plant. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 58:371-374, 1980.
3. ALLEN, M.F.; MOORE Jr, T.S. & CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 60:468-471, 1982.
4. ANTUNES, V. & CARDOSO, E.J.B.N. O fósforo e a micorriza vesículo-arbuscular no crescimento de porta-enxertos de citros cultivados em solo natural. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 14:277-282, 1990.
5. ANTUNES, V. & CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. *Plant Soil*, Hague, 131:11-19, 1991.
6. ASAI, T. Über die Mykorrhizenbildung der Leguminosen Pflanzen. *Jpn. J. Bot.*, Tóquio, 13:463-485, 1948.
7. AZCÓN, R.; BAREA, J.M. & HAYMAN, D.S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 8:135-138, 1976.
8. BALTRUSCHAT, H. Field inoculation of maize with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by using expanded clay as carrier material for mycorrhiza. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Stuttgart, 94:419-430, 1987.
9. BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Adv. Agron.*, New York, 36:1-54, 1983.
10. CARDOSO, E.J.B.N. Efeito da micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja - *Rhizobium*. *R. bras. Ci. Solo.*, Campinas, 9:125-130, 1985.
11. CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:17-23, 1986.
12. CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:25-30, 1986.
13. CARDOSO, E.J.B.N. & VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Problemas fitossanitários na produção de inoculante de fungo micorrízico vesículo-arbuscular. *Fitopatol. bras.*, Brasília, 10:671-674, 1985.
14. CARR, G.R.; HINKLEY, M.A.; LE TACON, F.; HEPPEL, C.M.; JONES, M.G.K. & THOMAS, E. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. *New Phytol.*, Oxford, 101:417-426, 1985.

15. CHAMBERS, C.A.; SMITH, S.E. & SMITH, F.A. Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytol.*, Oxford, 85:47-62, 1980.
16. CRUSH, J.P. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytol.*, Oxford, 73:743-749, 1974.
17. DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Effects of *Glomus* infection on three legumes. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*. New York. Academic Press. 1975. p.581-592.
18. DANIELS, B.A. & MENGE, J.A. Hyperparasitism of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, St. Paul, 70:584-588, 1980.
19. DEHNE, H.W. & BACKHAUS, G.F. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Stuttgart, 93:415-424, 1986.
20. DUDDRIGE, J.A. Specificity and recognition in mycorrhizal associations. In: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st. European Symposium on Mycorrhizae. Dijon, 1-5 July 1985. In: GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S., eds., Paris. 1986. p. 45-58.
21. ELMES, R.P. & MOSSE, B. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 62:1531-1536, 1984.
22. EZETA, F.N. & SANTOS, O.M. Benefício da introdução de endomicorriza eficiente na utilização de nutrientes em latossolos do Sul da Bahia. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 4:13-17, 1980.
23. GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 46:235-244, 1963.
24. GIANINAZZI-PEARSON, V.; FARDEAU, J.C.; ASIMI, S. & GIANINAZZI, S. Source of additional phosphorus absorbed from soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal soybeans. *Physiol. Vég.*, Paris, 19:33-43, 1981.
25. HAAS, J.H. & KRIKUN, J. Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytol.*, Oxford, 100:613-621, 1985.
26. HARDIE, K. & LEYTON, L. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. *New Phytol.*, Oxford, 89:599-608, 1981.
27. HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press, 1983. p. 483.

28. HAYMAN, D.S.; MORRIS, E.J. & PAGE, R.J. Methods for inoculating field crops with mycorrhizal fungi. *Ann. Appl. Biol.*, London, 99:247-253, 1981.
29. HAYMAN, D.S. & TAVARES, M. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. *New Phytol.*, Oxford, 100:367-377, 1985.
30. HEPPER, C.M. Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: The effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 11:269-277, 1979.
31. HEPPER, C.M. Isolation and culture of VA Mycorrhizal (VAM) fungi. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., eds. VA Mycorrhiza. Florida, CRC Press, 1984. p. 95-112.
32. HEPPER, C.M. & SMITH, G.A. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 66:189-194, 1976.
33. HO, I. Phytosterols in root systems of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Zea mays* L. *Lloydia*, Cincinnati, 40:476-478, 1977.
34. HOWELER, R.H.; ASHER, C.J. & EDWARDS, D.G. Establishment of an effective endomycorrhizal association on Cassava in flowing solution culture and its effects on phosphorus nutrition. *New Phytol.*, Oxford, 90:229-233, 1982.
35. LAMBAIS, M.R. Condições edáficas que afetam o micotrofia de *Stylosanthes guianensis* (AUBI) Sw. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1987, 102 p. (Dissertação de Mestrado).
36. LAMBERT, D.H.; COLE Jr.; H. & BAKER, D.E. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.*, Oxford, 85:513-520, 1980.
37. LIN, M.T.; MATTOS, M.A.M.; ASSIS, M. & CABEL, R. Influência de inoculantes endomicorrízicos no desenvolvimento de porta-enxertos micropropagados de macieira MM 106 em dois substratos. In: Programa e Resumos da II Reunião Brasileira sobre Micorrizas, São Paulo, 1987 a., pp. 10-11.
38. LIN, M.T.; MATTOS, M.A.; ASSIS, M. CABEL, R. Alta dependência endomicorrízica de plântulas micropropagadas de pera. In: Programa e Resumos da II Reunião Brasileira sobre Micorrizas, São Paulo, SP, 1987b. p.11-22.
39. LOPES, A.S. Solos sob "cerrado": características, propriedades e manejo. Instituto Internacional da Potassa, Ed. Piracicaba, SP, 1983. p. 162.
40. LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L. MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 7: 137-141, 1983.
41. MANJUNATH, A.; MAHAN, R. & BAGYARAJ, D.J. Interaction between *Beijerinckia mobilis*, *Aspergillus niger* and *Glomus fasciculatum* and their effects on growth of onion. *New Phytol.*, Oxford, 85:723-727, 1981.
42. MENGE, J.A. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 61:1015-1024, 1983.

43. MENGE, J.A. Inoculum production. In: POWELL, C.L. BAGYARAJ, D. J., Eds. VA Mycorrhiza. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1984. p.187-203.
44. MILLER-WIDEMAN, M.A. & WATRUD, L.S. Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. *Can. J. Microbiol.*, 30:642-646, 1984.
45. MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 11:171-196, 1973 a.
46. MOSSE, B. The role of mycorrhiza in phosphorus solubilization. GIAM IV. Global impacts of Applied Microbiology. 4 th International Conference Abstracts. São Paulo, Brazil, 1973 b.
47. MOSSE, B. Specificity in VA Mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, 1975. p.469-509.
48. MOSSE, B. The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In: VINCENT, J.M.; A.S. WHITNEY & J. BOSE (eds.). Exploiting the legume - *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. College of Agriculture Miscellaneous Publication: 275-295, 1987.
49. MOSSE, B.; POWELL, C.D.; HAYMAN, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IX. Interactions between VA mycorrhiza, rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *New Phytol.*, Oxford, 76: 331-342, 1976.
50. MOSSE, B. & THOMPSON, J.P. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 62:1523-1530, 1984.
51. NAGY, S.; NORDBY, H.E. NEMEC, S. Composition of lipids in roots of six citrus cultivars infected with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, Oxford, 85:337-384, 1980.
52. NORDBY, H.E.; NEMEC S., NAGY, S. Fatty acids and sterols associated with citrus root mycorrhizae. *J. Agric. Food Chem.*, 29:396-401, 1981.
53. OJALA, J.C. & JARRELL, W.M. Hydroponic sand culture systems for mycorrhizal research. *Plant Soil*, Hague, 57: 297-303, 1980.
54. PAIRUNAN, A.K.; ROBSON, A.D. & ABBOTT, L.K. The effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizas in increasing growth and phosphorus uptake of subterranean clover from phosphorus sources of different solubilities. *New Phytol.*, Oxford, 84:327-338, 1980.
55. ROSS, J.P. & GILLIAM, G. Effect of *Endogone* mycorrhiza on phosphorus uptake by soybeans from inorganic phosphate. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, Madison, 37:237-239, 1973.
56. ROSS, J.P. & RUTTENCUTTER, R. Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. *Phytopathol.*, 67: 490-496, 1977.
57. SANCHES, P.A. & SALINAS, J.G. Low-input technology for managing oxisols and ultisols in tropical America. *Adv. Agron.*, 34:279-406, 1980.

58. SCHENCK, N.C. & NICOLSON, T.H. A zoospore fungus occurring on species of *Gigaspora margarita* and other vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 69:1049-1053, 1977.
59. SCHENCK, N.C. & PEREZ, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. International Culture Collection of VA Mycorrhizal fungi (INVAM), Ed. University of Florida, Gainesville, Florida, 1987. p.245.
60. SIEVERDING, E. & SAIF, S.R. VA mycorrhiza management: a new, low cost, biological technology for crop and pasture production on infertile soils? Discussion paper for CIAT annual review, February 1, 1984. Cali, Colombia, 1984.
61. SILVEIRA, A.P.D. da & CARDOSO, E.J.B.N. Influência do tipo de solo e do fungo micorrízico vesículo-arbuscular no desenvolvimento de três cultivares de feijão. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 11:36-44, 1987.
62. SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; KIMBROUGH, J.W.; SCHENCK, N.C. *Stachybotrys chartarum* antagonistic to azygospores of *Gigaspora margarita*. *Soil Biol. Biochem.*, Ottawa, 16:679-681, 1984.
63. SIQUEIRA, J.O.; MAHMUD, A.W. HUBBELL, D.H. Comportamento diferenciado de fungos formadores de micorrizas vesicular-arbusculares em relação à acidez do solo. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 10:1116, 1986.
64. SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBELL, S.H. Spore germination, and germ tube elongation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 31:965-972, 1985.
65. SPARLING, G. P. & TINKER, P.B. Mycorrhizal infection in Pennine grassland. III. Effects of mycorrhizal infection on the growth of white clover. *J. Appl. Ecology*, London, 15: 959-964, 1978.
66. ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, J.O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G., 1985. p.36. (Série Documento, 26)

ECTOMICORRIZAS

Margarida M. Bellei⁽¹⁾ & Eulália Maria S. Carvalho⁽²⁾

INTRODUÇÃO

As micorrizas são estruturas complexas resultantes da simbiose de dois componentes: as raízes das plantas e certos fungos do solo. Nessa interação fungo-raiz, o fungo proporciona à planta uma maior capacidade de utilização de água e nutrientes, principalmente quando estes se encontram em níveis limitantes. Outros benefícios incluem maior tolerância da planta a condições de estresse tais como extremos de pH no solo, presença de metais e efeitos de agentes fitopatogênicos (1,18,24). A planta, por outro lado, fornece ao fungo fotossintatos necessários para o seu desenvolvimento e propicia um *habitat* intra-radicular protegido.

A maioria das plantas está associada a um de dois tipos de micorrizas que têm características estruturais diferentes: as ecto e as endomicorrizas (43,48). As ectomicorrizas cujo prefixo ecto indica "externo" (do grego "ektós"), são um tipo de micorriza em que, entre outras diferenças, o componente fúngico se desenvolve na raiz, nos espaços intercelulares do córtex, sem que ocorra penetração celular. O contrário ocorre nas endomicorrizas, em que o fungo se desenvolve intracelularmente.

As ectomicorrizas ocorrem em um grupo restrito de plantas (cerca de 5%) que, no entanto, são importantes economicamente, em particular para o setor florestal. Essas plantas com frequência, dependem obrigatoriamente da

⁽¹⁾ Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Universidade Federal de Santa Catarina, Caixa Postal 476, CEP 88.000, Florianópolis, SC.

⁽²⁾ Departamento de Fitotecnia - Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola da Socopo, CEP 64.050, Teresina, Pi.

simbiose, para atingirem um desenvolvimento adequado nos viveiros e para sobreviverem em local definitivo (33).

O benefício potencial das ectomicorrizas tornou-se atualmente mais evidente (40). Contribuiu para tal situação a necessidade recente na maioria dos países, de aumentar a produção de combustível proveniente de fontes renováveis (38). Conseqüentemente, em alguns países, programas de micorrização controlada vêm sendo desenvolvidos com êxito, propiciando aumentos significativos na produção de biomassa florestal. O estabelecimento desses programas tem sido acompanhado de implicações importantes. Os fungos ectomicorrízicos podem "moldar" as plantas para locais onde, isoladamente, não teriam produção viável do ponto de vista econômico, que implica um aumento das áreas utilizáveis pela incorporação de áreas marginais. A sua aplicação possibilita, também, redução considerável no uso de fertilizantes e biocidas e, conseqüentemente, o estabelecimento de uma agricultura menos dependente de energia e menos poluidora do ecossistema.

É nos trópicos, entretanto, que os benefícios da simbiose ectomicorrízica têm maior potencial para exploração. O desenvolvimento florestal nessas regiões é sobretudo baseado na introdução de exóticas que dependem obrigatoriamente de ectomicorrizas (31). Além disso, como a maioria das plantas apresenta endomicorrizas, a possibilidade de existência de inóculo natural, como ocorre nas regiões temperadas, é escassa. Finalmente, os solos tropicais são, com frequência, pobres em nutrientes, particularmente fósforo. As deficiências de nutrientes nas plantas crescidas nesses solos podem ser parcialmente supridas pelos fungos micorrízicos.

No Brasil, é praticamente desconhecida a condição micorrízica das plantas nas florestas nativas, e apenas algumas áreas restritas reflorestadas com exóticas, como o *Pinus* e *Eucalyptus*, foram, até o presente estudadas (7,39,45,52). Nessas regiões os fungos ectomicorrízicos foram introduzidos de forma não controlada, e as inoculações das mudas nos viveiros, quando ocorrem, ainda vêm sendo feitas de forma ineficiente. Os métodos de inoculação são usados de forma inadequada e contribuem para o estabelecimento irregular dos plantios, particularmente em regiões com solo de baixa fertilidade (7).

Entre os países tropicais, o Brasil dispõe de um dos programas de estabelecimento de plantações homogêneas mais arrojados, já que a taxa de plantio anual se aproxima de 500.000 ha. Esta taxa, no entanto, é insuficiente para atender às estimativas de perdas de florestas, e, até o ano 2000, estima-se que o Brasil deverá possuir 16 milhões de ha de área reflorestada, para que seja atendida a demanda interna e externa de madeira. Essa área poderá, no entanto, ser reduzida para 10 milhões de hectares, se novas técnicas que visem o aumento de produtividade florestal forem aplicadas.

HOSPEDEIROS E FUNGOS

HOSPEDEIROS

Em regiões temperadas

Cerca de 90% das árvores das florestas das regiões de clima temperado formam ectomicorrizas. São hospedeiros típicos de fungos ectomicorrízicos as plantas pertencentes às famílias Fagaceae (*Fagus*, *Quercus*), Tiliaceae (*Tilia*), Betulaceae (*Coryllus*, *Betula*) e Pinaceae. Todos os membros das Pinaceae, família que inclui gêneros de plantas de interesse florestal (*Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*,...), formam ectomicorrizas (22,29). O gênero *Pinus*, entretanto, inclui espécies temperadas e tropicais. No Brasil, os dois grupos podem ser encontrados em diferentes regiões.

A maioria das plantas das regiões temperadas apresenta apenas um tipo de micorriza. Contudo, algumas famílias tais como as Salicaceae e Rosaceae, podem se associar a ambos os tipos, ecto e endomicorrizas. O gênero *Alnus* que pertence às Betulaceae produz também os dois tipos.

Em regiões tropicais

É difícil generalizar sobre a condição micorrízica das plantas das regiões tropicais, uma vez que muitas áreas não foram ainda convenientemente estudadas. No entanto, alguns pesquisadores indicam que, nos trópicos cerca de 95% das árvores são endomicorrízicas; as ectomicorrízicas podem, entretanto, ocorrer nas plantas das famílias Cesalpiniaceae, Dipterocarpaceae, Myrtaceae (*Eucalyptus*), Fagaceae (*Quercus*), Pinaceae (*Pinus*) e algumas Euphorbiaceae (22). Nas regiões tropicais, as ectomicorrizas estão geralmente associadas a florestas densas, monoespecíficas e desenvolvidas em solos pouco férteis (25).

Em regiões de vegetação nativa, tipo cerrado, foram encontradas no Brasil, entre 58 espécies, apenas duas com ectomicorrizas: *Balbinia hotophila* (Cesalpiniaceae) e *Campomanesia coerulea* (Myrtaceae) (46).

As principais exóticas utilizadas no reflorestamento de extensas áreas nos trópicos, o *Pinus* e o *Eucalyptus*, apresentam também ectomicorrizas. O *Eucalyptus*, entre outros poucos gêneros, pode apresentar tanto ecto como endomicorrizas. No entanto, quando adulta em seu *habitat* natural, é sobretudo ectomicorrízica (22). No Brasil, as ectomicorrizas parecem também predominar em plantios adultos nas regiões do sul do país, particularmente em Santa Catarina e no sudeste de Minas Gerais, enquanto que as endomicorrizas incidem particularmente em plantios jovens (até 12 meses) e nos viveiros quando o substrato utilizado veicula o inóculo destes fungos.

FUNGOS

Em regiões temperadas

Estima-se que mais de 2000 espécies de fungos sejam potencialmente ectomicorrízicas nas regiões de clima temperado. Destas, a maior parte pertence à subdivisão Basidiomycotina, alguns são gêneros dos Ascomycotina e apenas um gênero pertence a Zygomycotina (47). Entre os Basidiomycotina, famílias inteiras desenvolveram a capacidade micorrízica. Em outros casos, apenas alguns gêneros dentro de uma família, ou uma família inteira, podem não dispor de membros com essa capacidade (12). Os principais gêneros e espécies de fungos foram apresentados em diversas publicações. Os gêneros mais frequentemente encontrados são: *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Gomphidius*, *Hebeloma*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Russula*, *Tricholoma*, *Rhizopogon*, etc.

É comum uma espécie de planta estar associada a centenas de fungos ectomicorrízicos. Alguns destes fungos podem associar-se a diversos hospedeiros (especificidade alta), enquanto que outros são hospedeiros específicos (especificidade restrita). Em casos de especificidade restrita, é possível distinguir dentre uma espécie de fungo, isolados ou ecótipos, especialmente adaptados a certos hospedeiros (32).

Em regiões tropicais

Existem poucos trabalhos com descrições claras ou ilustrações sobre a ocorrência de ectomicorrizas em plantas de regiões tropicais. Recentemente, em 1986, foram estudados em vários países (Zâmbia, Tanzânia, Índia, Gana, Nova Guiné, Peru) dezessete gêneros de plantas nativas pertencentes a seis famílias (5). Embora diversos tipos de ectomicorrizas tenham sido caracterizados, apenas duas espécies de fungos ectomicorrízicos foram identificados. É provável que o isolamento em meio de cultura dos simbiontes seja difícil, devido ao desconhecimento das exigências nutricionais desses fungos (3).

No que se refere a *Pinus*, planta que ocorre em extensas áreas de florestas nos trópicos, foram efetuados diversos levantamentos que identificaram fungos associados a espécies tropicais em diferentes regiões, particularmente na América Central e no Caribe (31). A maioria dos fungos ectomicorrízicos associados aos *Pinus* exóticos inclui espécies como: *Suillus granulatus*, *Rhizopogon luteolus*, *Boletus luteus*, *Scleroderma bovista* e *Hebeloma crustuliniforme*.

No Brasil, o potencial micorrízico de florestas nativas e exóticas é praticamente desconhecido. Alguns levantamentos em áreas específicas e em florestas homogêneas de *Pinus* em Minas Gerais permitiram a identificação dos seguintes fungos: *Suillus granulatus*, *Inocybe lanuginella* e *Scleroderma fuscum* (7). *Telephora terrestris* e *Rhizopogon* spp. foram também identificados em diver-

sas espécies de *Pinus* e regiões no país. Em florestas de *Eucalyptus* em Viçosa (MG), foram encontrados *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma* sp. em um levantamento realizado (39). A presença de *P. tinctorius* em diversas espécies de *Eucalyptus* em São Paulo e Santa Catarina, foi também confirmada (52). A pouca diversidade de simbiontes nas regiões de *Pinus* tropicais em Minas Gerais, contrasta com a alta diversidade verificada em algumas plantações comerciais de *Pinus* em Santa Catarina. Estas plantações possuem, no entanto, *Pinus* de regiões temperadas e fungos típicos dessas regiões (*Amanita*, *Rhizopogon*, *Inocybe*).

Identificação do fungo

A identificação precisa do fungo simbionte da ectomicorriza é fundamental. No entanto, a maior parte dos fungos citados como ectomicorrízicos na literatura resulta de observações da ocorrência freqüente de frutificações em associação com uma espécie de planta e, também, de resultados de síntese in vitro da micorriza, isto é, produção da micorriza a partir de simbiontes assépticos em condições controladas de laboratório. Poucas são citadas como resultado da utilização de critérios que conferem maior validade à identificação. Esse fato tem levado à utilização em trabalhos de pesquisa e na prática de fungos ectomicorrízicos cuja associação provavelmente, não ocorreria em condições naturais. Com a finalidade de identificar o fungo simbionte da ectomicorriza, Zak (50), definiu 4 critérios:

- a) verificação de conexão entre micorriza e esporocarpo;
- b) comparação dos micélios circundantes da micorriza e esporocarpo (por análise de cor e reação com bases e ácidos);
- c) isolamento do fungo ectomicorrízico, sendo que, este isolamento pode ser feito: (1) a partir de ectomicorriza (manto fúngico que encobre a raiz); e (2) a partir de esporocarpo;
- d) e síntese da ectomicorriza in vitro (inoculação do fungo em plântulas cultivadas em substrato esterilizado).

MORFOLOGIA

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Em corte transversal, uma ectomicorriza inclui três componentes fúngicos perfeitamente identificáveis ao microscópio: a manta fúngica (m), a rede de Hartig (R) e o micélio circundante (mc) (Figura 1) (12,15,23).

A manta fúngica é uma massa de hifas, esparsa ou por vezes espessa, que pode desenvolver em alguns casos a organização de um falso tecido

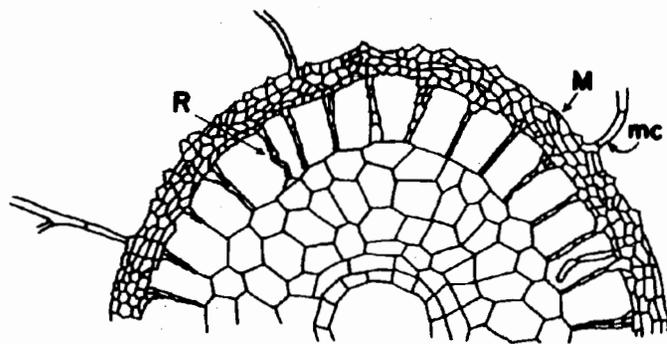


Figura 1. Corte transversal de ectomicorriza.
M: manta fúngica; R: rede de Hartig; mc: micélio circundante.

parenquimatoso e que rodeia externamente a raiz (12). A manta varia em estrutura e espessura. Diferenças na estrutura da manta incluem: maior ou menor coesão das hifas, conformação das hifas, presença de ornamentos (cistídeos), etc. A sua espessura varia em regra entre 20-40 μm , o que pode representar uma biomassa significativa da micorriza (entre 20 a 40% do volume total da micorriza e entre 35 a 40% do peso seco). A manta é um dos componentes da ectomicorriza com maior importância na classificação, constituindo um local de armazenamento de reservas nutricionais e desempenhando papel importante na exclusão de agentes fitopatogênicos (16).

A **Rede de Hartig** é uma região da micorriza em que o fungo, ligado externamente à manta, penetra a raiz, intercelularmente, ocupando algumas camadas do córtex, sem, porém, ultrapassar a endoderme. É o local que inclui a interface hospedeiro-fungo e onde se estabelecem as trocas entre os simbiontes. Esta interface pode ser de dois tipos: parede da célula da planta - parede do fungo ou parede da célula da planta modificada (zona de contato) - parede do fungo. Essa zona de contato parece resultar de uma modificação produzida pelo fungo na célula da planta. A interface de contato planta-fungo ocupa uma área extensa uma vez que as hifas se ramificam de forma labiríntica e produzem enzimas modificadoras da parede da planta que atuam na formação da zona de contato.

O processo da morfogênese de uma ectomicorriza pode ser dividido em diversas fases: desenvolvimento do fungo estimulado pelos metabólitos radiculares; formação de um envelope de hifas na raiz (manta insipiente); penetração intercelular por hifas isoladas (rede de Hartig); modificações da morfologia do fungo e formação de um tecido labiríntico na rede de Hartig com extensão do tecido

labiríntico para a formação da manta. A verdadeira manta fúngica é, portanto, formada posteriormente ao estabelecimento do fungo no córtex na rede de Hartig.

O **micélio circundante** que irradia no solo em torno da raiz pode ser esparso ou denso e pode incluir hifas isoladas, feixes de hifas ou rizomorfas, escleródios e frutificações. Na produção de cada um desses elementos estão envolvidos fatores hormonais e nutricionais específicos. Assim, as rizomorfas, que são cordões de hifas altamente organizados que atingem grandes extensões, exigem para a sua formação uma razão crítica entre teor de carbono e nitrogênio no substrato. Essas estruturas estão relacionadas com o transporte de água e nutrientes do solo para a planta. A sua organização, que é variada, possibilita o transporte de nutrientes com eficiência e resiste à seca e ao atrito no solo. A ocorrência de frutificação dos simbiontes fúngicos, por sua vez, é restrita a épocas do ano específicas porque depende de condições ambientais e do estado nutricional e hormonal do fungo.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

A ectomicorriza, quando comparada com a raiz não colonizada, cresce mais lentamente e tem um padrão de crescimento diferente (16). Por este motivo é frequentemente possível reconhecer ectomicorrizas a olho nú no próprio local de coleta. O padrão de crescimento da ectomicorriza é determinado pelo hospedeiro. Harley (15) usou características da morfologia grosseira das ectomicorrizas para a sua classificação. Considerou diferentes tipos de ectomicorrizas de Faia que designou como ectomicorrizas superficiais, piramidais, coralóides e nodulares, entre outros.

As *ectomicorrizas superficiais* são semelhantes às raízes não colonizadas, das quais diferem, no entanto, por apresentarem uma manta destacável. As *piramidais*, que podem também ocorrer em *Eucalyptus*, são conjuntos de micorrizas simples que evoluem para sistemas complexos (agrupamentos de micorrizas) denominados sistemas piramidais, visto que as micorrizas se distribuem em torno de um eixo radicular e são progressivamente menores na direção deste eixo, tal como em uma pirâmide. As ectomicorrizas *dicotômicas* são aquelas em que a raiz se bifurca e, quando de forma repetida são chamadas *coralóides*. Os tipos dicotômicos e coralóides são frequentemente encontrados em espécies de *Pinus*. Este gênero pode também apresentar *ectomicorrizas nodulosas* quando as bifurcações são curtas e repetidas assemelhando-se a nódulos. Este tipo, no entanto, ocorre com pouca frequência.

Para além destas modificações morfológicas, as ectomicorrizas são, geralmente, brancas, negras ou coloridas, de forma idêntica à coloração do fungo simbiote envolvido, o que facilita a sua detecção na manta morta de folhas ou no solo da floresta.

SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO

Vários sistemas de classificação têm sido propostos para diferenciar tipos de ectomicorrizas e identificar fungos simbiotes pelas características morfológicas e anatômicas da micorriza. As ectomicorrizas são classificadas com base em aspectos morfológicos, padrões de ramificação, cor e estrutura superficial.

Os sistemas de classificação propostos inicialmente agrupavam as ectomicorrizas em tipos morfológicos de definição ampla, com base em critérios arbitrariamente escolhidos e supostamente constantes, como por exemplo, a morfologia e a cor. Melin (28) enquadrou as ectomicorrizas em quatro grupos com base na morfologia. Em 1959, Dominik (10) utilizou um sistema mais minucioso, mas não considerou a espécie do hospedeiro, agrupando as micorrizas em 12 subtipos de acordo com a cor, estrutura e características superficiais da manta. Publicou posteriormente, em 1969 (11), uma chave para designar ectomicorrizas coletadas em condições naturais que é, até hoje, uma das mais completas para a determinação de tipos de ectomicorrizas. Um dos inconvenientes na sua utilização, no entanto, é a distinção feita por Dominik entre vários tipos de ectomicorrizas com base em características observadas em cortes transversais e na cor da ectomicorriza.

Mais recentemente, as ectomicorrizas têm sido agrupadas de acordo com critérios de baixa variabilidade e os sistemas de classificação têm procurado agrupar as ectomicorrizas de um gênero ou espécie de planta de importância econômica para países ou regiões específicas de um país. Na Austrália, Chilvers (8) propôs um sistema de classificação de ectomicorrizas de eucalipto baseado principalmente na organização do tecido da manta e na estrutura das rizomorfias. Essa caracterização possibilitou a distinção de oito tipos de ectomicorrizas desse hospedeiro. Nos EUA, Zak (50), em 1971, propôs um sistema de caracterização e identificação de ectomicorrizas de coníferas, com base, principalmente, em características do micélio circundante, das rizomorfias, da textura do manto e da cor desenvolvida na presença de reagentes químicos. Posteriormente, em 1973, Zak (51), ampliou seu sistema pela inclusão de outras características, dentre elas a espécie do hospedeiro.

Diversos pesquisadores têm revisto mais recentemente os sistemas de classificação e confirmado a deficiência nas descrições efetuadas das ectomicorrizas, bem como a carência de ilustrações adequadas para o reconhecimento macroscópico das micorrizas (2,4). No sentido de minimizar estes inconvenientes, uma chave diagnóstica para as ectomicorrizas em geral foi publicada por Agerer, em 1987, no *Atlas Colorido de Ectomicorrizas* (3), que tem por objetivos caracterizar as ectomicorrizas formadas por diversos fungos em hospedeiros, tais como *Picea*, *Fagus*, *Pinus*, *Larix* e *Betula*, e apresentar descrições das características da morfologia das ectomicorrizas. O atlas apresenta também ilustrações dos fungos simbiotes envolvidos e das micorrizas correspondentes.

É, entretanto, lastimável que os sistemas de classificação de ectomicorrizas propostos até o presente não tenham sido experimentados em um número de casos representativo.

FISIOLOGIA

As ectomicorrizas representam uma forma de simbiose mutualística ou de parasitismo duplo em que intervêm balanços sensíveis de forças entre os simbiotes e são produzidos diversos metabólitos que viabilizam a interação. Sob esta perspectiva os fungos ectomicorrízicos se comportam como parasitas cuja capacidade agressiva é neutralizada no sentido do mutualismo pelas forças de proteção da planta hospedeira (30). Devido à complexidade anatômica da simbiose micorrízica o estabelecimento de técnicas de cultivo *in vitro* dos simbiotes e de síntese de ectomicorrizas facilitou sobremaneira a definição das necessidades nutricionais para crescimento de cada simbiote e do seu papel na interação.

O QUE RECEBE O FUNGO

Fontes de carbono

Os fungos ectomicorrízicos utilizam no cultivo *in vitro* um grande número de hexoses, tais como a glicose, manose e a frutose; dissacarídeos como a celobiose, a sacarose e a trealose; e ainda certas glucanas como o amido, a pectina e a dextrina (12). Ao contrário da maioria dos decompositores de matéria orgânica da serapilheira, a capacidade destes fungos para degradar, *in vitro*, fontes de carbono complexas como a celulose e a lignina é limitada, e nem todos utilizam a pectina. Em consequência, os fungos ectomicorrízicos são fracos competidores em condições saprofitas, na rizosfera, uma vez que nessa região competem pelas formas mais simples de carbono que são efêmeras e consumidas por numerosos microrganismos. Em simbiose com as plantas, por outro lado, ocupam um habitat privilegiado, ao abrigo da competição e antibiose resultantes das atividades da microbiota rizosférica e têm assegurado o suprimento de compostos de carbono que é derivado do hospedeiro fotolito-trófico.

Diversos pesquisadores demonstraram que os fotossintatos, particularmente a sacarose, constituem a principal forma de carbono translocado no floema, sendo transferidos na raiz da planta para o fungo (14,16).

A sacarose translocada é hidrolisada em glicose e frutose, que rapidamente se convertem em substâncias de reserva (trealose, manitol e glicogênio) para o fungo. Estes carboidratos não são diretamente utilizáveis pela planta. O dreno a partir da fonte de produção é, por sua vez, mantido, porque as substâncias de reserva são consumidas pelo fungo, e, em consequência, é estimu-

lada a translocação de sacarose para a raiz o que, por sua vez, estimula a fotossíntese. A produção de hormônios pode também estar envolvida nesta estimulação.

Fatores de crescimento

Os basidiomicetos, que formam ectomicorrizas requerem frequentemente, vitaminas do grupo B, como a tiamina, a biotina, o ácido pantotênico nicotínico e o inositol para crescimento *in vitro*. Em alguns casos, porém, não é suficiente a adição dessas vitaminas e fatores estimulantes desconhecidos, que estão presentes nos exsudatos radiculares e nos extratos de serapilheira e de levedura, é que são requeridos para o crescimento desses fungos.

Alguns fungos mais exigentes, ainda, crescem apenas na presença do sistema radicular de plantas hospedeiras e outros, tais como *Clavaria* sp., não foram até o presente cultivados *in vitro*, o que define exigências estritas para crescimento.

O QUE RECEBE A PLANTA

Nutrientes

A simbiose ectomicorrizica propicia uma ampliação no tempo e no espaço do sistema de absorção de nutrientes para a planta. As ectomicorrizas têm maior longevidade que as raízes não infectadas e propiciam um aumento da capacidade de exploração do solo, devido sobretudo, à presença do micélio circundante. Este micélio torna a ectomicorriza mais eficiente na absorção de nutrientes, particularmente quando estes se encontram em níveis limitantes.

São principalmente íons, tais como, o NH_4^+ , SO_4^{2-} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , relativamente imóveis na solução do solo, cuja absorção pelas micorrizas é mais estimulada. As hifas ou rizomorfas do fungo ectomicorrizico no solo substituem eficientemente os pêlos radiculares da planta e translocam ainda, água e alguns nutrientes orgânicos.

Nitrogênio

O crescimento *in vitro* dos fungos ectomicorrizicos é mais rápido na presença de amônio (NH_4^+) do que nitrato (NO_3^-) (14). O amônio é, também, a forma de nitrogênio mais comum nos habitats da maioria dos hospedeiros de fungos ectomicorrizicos, cujo baixo pH não facilita os processos de nitrificação. Em solos calcáreos, por outro lado, os nitratos são predominantes, e, nessas condições, representam papel importante, os fungos, que podem também utilizar os nitratos.

O amônio é rapidamente absorvido e translocado pelo fungo até a manta fúngica, onde, juntamente com o carbono derivado das reservas (carboidra-

tos) do fungo, são biossintetizados aminoácidos (ácido glutâmico e a glutamina). É possível que estes aminoácidos são mantidos na forma solúvel para o suprimento da planta em condições de carência sendo a rede de Hartig o local de transferência dos aminoácidos do fungo para a planta.

Segundo modelo sugerido por France & Reid (14), em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, é na raiz que os aminoácidos se acumulam e, gradativamente, são utilizados no suprimento das necessidades de crescimento desse órgão. Quando o carbono se torna limitante, o transporte de aminoácidos é redirecionado para o caule, resultando em crescimento da parte aérea, produção de fotoassimilados e, seguidamente, translocação de carboidratos para a raiz. Estes carboidratos são, portanto, fundamentais na manutenção da biomassa fúngica e, ainda, no suprimento de carbono para biossínteses de compostos nitrogenados, utilizados pela planta hospedeira.

Fósforo

O fósforo pode estar presente nos solos em duas formas: inorgânico (disponível e não disponível) e orgânico, principalmente sob a forma de fitatos e fosfatos de inositol. As plantas requerem fosfato na sua nutrição e a sua absorção do solo é tornada problemática não só pelo fato desses íons serem relativamente imóveis, como também por, frequentemente, se encontrarem em baixa disponibilidade na solução do solo. O poder de absorção da planta com ectomicorrizas, para os fosfatos, varia com diversos fatores do meio. Tais fatores podem ser bióticos (isolado do fungo ectomicorrizico) e abióticos (umidade, temperatura, concentração do H_2PO_4^- na solução do solo, etc.)

Inúmeras pesquisas têm mostrado que as ectomicorrizas melhoram a eficiência na absorção de fosfato, o que em parte explica o estímulo no crescimento das plantas com ectomicorrizas, principalmente quando estas últimas são desenvolvidas em solos nutricionalmente pobres (6,12,16,28).

A maior parte do fosfato absorvido pelo fungo é acumulado na manta fúngica, subseqüentemente a períodos de alta disponibilidade. Do total absorvido, 30-45% são convertidos em reservas de polifosfatos que podem ser visualizados como grânulos corados metacromáticos, após coloração com azul de toluidina. Esta conversão em polifosfato é rápida e depende de energia. A transferência de fosfatos ocorre a nível da rede de Hartig e é um processo complexo.

Existe controvérsia sobre a possibilidade das ectomicorrizas propiciarem a utilização de formas de fósforo não diretamente disponíveis. A produção de fosfatases tem sido apontada como um mecanismo que viabiliza, nesses fungos, a capacidade de aumentar a disponibilidade de P no solo por solubilização (17,34). Os fungos ectomicorrizicos exsudam também ácidos orgânicos que podem atuar como quelantes de metais. Esta capacidade dos fungos ectomicorrizicos pode ser

constatada pela visualização de cristais de oxalato de cálcio na manta de algumas ectomicorrizas, particularmente em *Pinus*. O ácido oxálico produzido por fungos ectomicorrízicos tem sido responsabilizado pelo aumento na disponibilidade de P, Ca, Mg e Al na solução do solo. No entanto, alguns experimentos designados para comprovar a capacidade solubilizadora de fosfatos pelos fungos ectomicorrízicos não confirmam esta hipótese.

Outros minerais

Estudos com elementos radioativos têm mostrado que os fungos ectomicorrízicos absorvem e translocam outros íons que não o fosfato, amônio ou nitrato. As rizomorfas e as frutificações dos fungos no solo dispõem de concentrações mais altas de Cu, Mn, Mg, Ca, Fe e Zn do que os órgãos das plantas sem micorrizas.

Metabólitos diversos

Três tipos de metabólitos, produzidos por fungos ectomicorrízicos, podem influir nas atividades fisiológicas das plantas hospedeiras: os hormônios ou reguladores de crescimento, os ácidos orgânicos (como foi discutido anteriormente) e os antibióticos (12,16,30,41).

Os fungos micorrízicos podem sintetizar, *in vitro*, auxinas, citoquininas e giberelinas. Para além das modificações morfológicas induzidas nas raízes, as auxinas podem também estar envolvidas em modificações fisiológicas necessárias à simbiose.

As auxinas atuam na conversão do amido (substância de reserva da planta) em carboidratos simples. Estes carboidratos são mobilizados do ponto de reserva para o local de produção da auxina, sendo que esta normalmente se concentra nas gemas e caules jovens, onde se mantêm os suprimentos nutricionais para as regiões em crescimento. É provável que estes mecanismos possibilitem da mesma forma a translocação de carboidratos para a raiz, em resposta à infecção micorrízica.

As citoquininas podem também ser operantes na interação micorrízica, já que a maioria dos fungos ectomicorrízicos isolados as produz. O seu papel, entre outros, pode estar relacionado com o retardamento do processo de maturação e suberização das raízes, o que pode implicar no aumento da longevidade das ectomicorrizas. As citoquininas podem, ainda, influenciar a mobilização de nutrientes (35).

O papel das giberelinas, entretanto, encontra-se pouco esclarecido, mas parece provável a atuação de giberelinas na hidrólise de reservas, pela interferência na produção de enzimas degradativas.

Alguns fungos ectomicorrízicos produzem antibióticos *in vitro* que, comprovadamente, estão envolvidos em processos de antibiose atuante na rizosfera. Este mecanismo promove, assim, a tolerância das plantas aos efeitos de agentes fitopatogênicos radiculares (26,27).

FATORES QUE AFETAM A COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA

A formação de ectomicorrizas resulta de uma interação complexa de três elementos: o fungo, a planta e o ambiente. Consequentemente, diversos fatores ligados a esta trilogia afetam, de forma direta ou indireta o processo e a infecção.

O potencial de inóculo do fungo micorrízico (PIM) associado à densidade do sistema radicular condiciona o número de micorrizas que podem ser formadas em um tipo de solo.

A idade, a proveniência e as características genéticas do hospedeiro influem também na colonização micorrízica. Algumas plantas, tais como o *Eucalyptus* podem apresentar uma sucessão de infecções micorrízicas dependendo da idade. Plantas jovens (até 12 meses) apresentam endomicorrizas e, subsequentemente, a infecção ectomicorrízica predomina. Este fato, porém, parece depender do potencial de inóculo de fungos micorrízicos presentes na região e do nível de fertilização do solo.

As condições fisiológicas do hospedeiro podem determinar o estabelecimento da infecção micorrízica. Com base neste fato, Bjolkman definiu uma teoria, segundo a qual a formação de micorrizas estaria na dependência única do teor de carboidratos na raiz, isto é, na dependência da atividade fotossintética do hospedeiro (16,30). Esta teoria, no entanto, não foi sustentada por outros pesquisadores, que consideram o aumento da concentração de carboidrato na raiz como efeito e não a causa da infecção, já que os fungos ectomicorrízicos, pela sua capacidade de produzirem auxinas, podem mobilizar as reservas da planta sob a forma de carboidratos para a raiz. De forma geral é possível estabelecer que os fatores que intervêm na atividade fotossintética e que reduzem a produção de fotoassimilados não promovem a infecção micorrízica. A baixa intensidade luminosa, por exemplo, pode, além de interferir na capacidade fotossintética, reduzir nas plantas a produção de metabólitos fundamentais ao estabelecimento da simbiose. O fotoperíodo desempenha um papel comparável à intensidade luminosa.

As propriedades do solo afetam a atividade de ambos os simbiontes (42). Os fungos ectomicorrízicos requerem geralmente para crescimento ótimo *in vitro*, pH entre 4 e 6, sendo, portanto, acidófilos. O pH ótimo para a formação de ectomicorrizas *in vitro* corresponde aos níveis ótimos de pH para crescimento do fungo em cultura pura. Em condições naturais, porém, é possível que ocorra uma

adaptação dos fungos ectomicorrízicos a diferentes níveis de pH do solo, uma vez que é frequente a coexistência de isolados de fungos na mesma região, que dispõem de amplas variações nos valores de pH ótimo para o crescimento *in vitro*.

As temperaturas ótimas do solo, para a infecção e colonização das raízes por fungos ectomicorrízicos, diferem da temperatura ótima para crescimento dos fungos em cultura pura. Em condições naturais a formação de ectomicorizas ocorre, frequentemente, a temperaturas mais baixas do que aquelas requeridas para crescimento máximo *in vitro*. As temperaturas do solo interferem, ainda, com o hospedeiro (quantidades e composição de exsudatos radiculares; processos de alongamento e maturação de raiz, etc) e, assim, influenciam indiretamente o processo de infecção micorrízica.

As temperaturas ótimas do solo, para a infecção e colonização das raízes por fungos ectomicorrízicos, diferem da temperatura ótima para crescimento dos fungos em cultura pura. Em condições naturais a formação de ectomicorizas ocorre, frequentemente, a temperaturas mais baixas do que aquelas requeridas para crescimento máximo *in vitro*. As temperaturas do solo interferem, ainda, com o hospedeiro (quantidades e composição de exsudatos radiculares; processos de alongamento e maturação de raiz, etc) e, assim, influenciam indiretamente o processo de infecção micorrízica.

A umidade do solo é um fator importante na formação das ectomicorizas, que são mais frequentes em regiões úmidas e de baixa altitude do que nas regiões secas. No entanto, o excesso de umidade no solo reduz drasticamente a infecção, já que a ausência de oxigênio interfere no desenvolvimento de ambos os simbioses.

EFEITO SOBRE AS PLANTAS

NO CRESCIMENTO

A presença de ectomicorizas geralmente implica em aumento do vigor das plantas. Este aumento é, em parte, resultante de uma melhor eficiência na capacidade de absorção da raiz em relação aos nutrientes. A melhor eficiência radicular é devida aos fatores descritos a seguir:

a) Modificações da geometria da raiz ocorridas após a infecção e que amplificam a área de absorção da ectomicorriza. Estas modificações podem ser devidas a um estímulo na ramificação e alongamento das raízes colonizadas (interferência hormonal), ou a um aumento da espessura radicular ligada à presença da manta. Por este motivo, a colonização por fungos micorrízicos implica ainda modificação na distribuição da biomassa entre raiz e caule. As plantas com micorizas geralmente têm valores da razão entre peso da raiz e do caule (R/C) menores do que plantas equivalentes não micorrizadas.

b) Aumento da área de absorção devido à presença do micélio circundante da micorriza, cujas redes de hifas têm como papel principal a captação de nutrientes de volumes do solo maiores do que aqueles alcançados pelas raízes e sua veiculação para a planta.

Outros fatores que discutiremos em seguida podem também contribuir para o maior vigor das plantas com micorizas.

NA RIZOSFERA

A colonização por fungos ectomicorrízicos implica na formação, sob influência da micorriza, de uma região radicular que mantém uma atividade microbiana diferente da raiz não colonizada. Esta região é designada **micorizosfera**.

A microbiota da micorizosfera é diferente, qualitativa e quantitativamente, da microbiota da rizosfera. Alguns microrganismos presentes nessa região são suscetíveis de aumentar a disponibilidade de nutrientes para plantas, como é o caso dos fixadores de nitrogênio assimbióticos (*Beijerinckia*, *Clostridium*) (12).

TOLERÂNCIA A DOENÇAS

As ectomicorizas podem intervir, através de outros mecanismos que não a antibiose, no controle biológico de doenças provocadas por agentes fitopatogênicos radiculares. Entre esses mecanismos está a exclusão mecânica, devido à presença da manta fúngica que atua como barreira física no processo de infecção por patógenos radiculares. Assim, a ocorrência de diversas doenças radiculares causadas por *Phytophthora*, *Pythium* ou *Rhizoctonia*, e frequentemente constatadas em mudas jovens nos viveiros, pode ser reduzida pelo estabelecimento da simbiose (26,27).

Por outro lado, as ectomicorizas podem em alguns casos tornar as plantas mais suscetíveis a certo agentes fitopatogênicos, particularmente aqueles envolvidos em doenças foliares.

TOLERÂNCIA À PRESENÇA DE METAIS

O papel das ectomicorizas na tolerância das plantas a níveis tóxicos de metais é complexo. As ectomicorizas podem proporcionar, no campo, a inativação parcial, nas plantas, de concentrações, em níveis tóxicos, de metais, como, por exemplo, o zinco, presente no solo após fertilizações com matéria orgânica proveniente de esgoto. Recentemente, pesquisas realizadas em condições controladas mostraram que é impossível estabelecer generalizações sobre o papel

das ectomicorrizas na tolerância a metais. Os efeitos em uma planta dependem do fungo simbiote e do metal envolvidos e, ainda, da concentração do metal no substrato (19).

Nem todos os fungos são igualmente eficientes no aumento da capacidade das plantas para se desenvolverem na presença de metais. A variabilidade na resposta a níveis de alumínio em isolados de uma espécie foi constatada em *Pisolithus tinctorius* associado a *Eucalyptus*, em regiões do cerrado cujos solos dispõem de altos níveis desse metal (49). Fungos ectomicorrízicos com tolerância a metais devem ser selecionados para a utilização em programas de micorrização controlada, já que o estabelecimento da simbiose depende da tolerância do fungo ao metal presente no solo. Um fungo ectomicorrízico determinado pode ainda conferir tolerância de uma planta a um metal e não ter efeito na tolerância a outro metal.

O aumento da tolerância a metais pela infecção por fungos ectomicorrízicos parece ainda ser eficiente em doses baixas ou intermediárias do metal (19). Atenuação da toxidez de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn não foi verificada em altas doses destes metais, o que sugere a interferência de um mecanismo ligado a pontos de saturação (9). Alguns pesquisadores sugerem a possibilidade de que a proteção das raízes pela manta (exclusão do metal) e a adsorção do metal na parede fúngica sejam mecanismos operantes na detoxificação. Foram sugeridos ainda outros mecanismos, tais como a precipitação de oxalatos metálicos nos espaços intercelulares do fungo e da planta e, ainda, a complexação e inativação (detoxificação metabólica) dos metais dentro das hifas fúngicas.

TOLERÂNCIA À SECA

Embora o efeito benéfico do crescimento seja devido, principalmente, a uma melhoria na eficiência da absorção de nutrientes pelas plantas, outros benefícios podem advir da presença dos fungos ectomicorrízicos.

A tolerância à seca pode ser induzida nas plantas, quando determinados fungos as colonizam (33,36). Este é o caso de *Cenococcum graniforme*, *Pisolithus tinctorius* e *Rhizopogon vinicolor*. A capacidade de absorção de água é estimulada pela presença de ectomicorrizas providas de rizomorfias, que funcionam como órgão de captação, particularmente em condições de estresse hídrico (13).

APLICAÇÕES PRÁTICAS

SITUAÇÕES QUE REQUEREM INOCULAÇÃO

A importância dos fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento e sobrevivência de plantas de interesse florestal ficou evidente quando as tentativas

de introdução de *Pinus*, em regiões desprovidas de hospedeiros destes fungos, falharam em vários países.

Em regiões sujeitas a reflorestamentos e providas de inóculo natural de fungos ectomicorrízicos, as inoculações artificiais têm um dentre esses dois objetivos:

- a) Aumentar a densidade de inóculo existente; e
- b) Introduzir fungos mais eficientes e competitivos.

Nos viveiros onde são efetuadas desinfestações do solo, as quais visam à redução dos efeitos dos agentes fitopatogênicos e, paralelamente reduzem a viabilidade dos propágulos de fungos ectomicorrízicos, é geralmente necessária a inoculação destes fungos, a fim de aumentar a densidade de inóculo existente. Mudanças produzidas em substratos inertes, tais como a vermiculita, geralmente sujeitas a altas fertilizações, também não dispõem de micorrizas. Essas mudas, quando transplantadas, apresentam baixa sobrevivência e crescimento reduzido, o que implica estabelecimentos irregulares, replantio extensos e até abandono, a longo prazo, das áreas reflorestadas.

A introdução de fungos ectomicorrízicos de eficiência comprovada e mais competitivos tem sido efetuada com sucesso (21, 22, 44). Algumas situações que requerem a inoculação artificial de fungos ectomicorrízicos são apresentadas no quadro 1.

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Diversos métodos de inoculação artificial são comumente utilizados, conforme resumo no quadro 2 (37).

SELEÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS

A seleção de fungos ectomicorrízicos pode ser efetuada em quatro níveis distintos ou combinados, desde o cultivo *in vitro*, até casa de vegetação e campo.

Quadro 1. Situações que requerem a introdução de fungos ectomicorrízicos

| |
|---|
| Fora do habitat natural dos simbiotes |
| Em solos sujeitos à erosão |
| Em regiões sujeitas a repouso prolongado |
| Em regiões de cultivo sistemático de plantas endomicorrízicas |
| Em solos sujeitos a desinfestação, fertilização e uso de defensivos agrícolas |
| Em substratos inertes tipo vermiculita, turfa, utilizados nos viveiros |
| Em regiões sujeitas a queimadas sistemáticas |

Quadro 2. Métodos de inoculação de fungos ectomicorrízicos

| Métodos | Observações e desvantagens |
|--|--|
| Inoculação espontânea | Micorrização não uniforme Não permite seleção dos fungos |
| Solo, acícula (terriço) de florestas estabelecidas | Não permite seleção dos fungos Problemas logísticos Facilita disseminação de patógenos |
| Raízes destacadas | Facilita disseminação de patógenos Não permite seleção dos fungos Restrito para pequenas áreas |
| Esporos, esporocarpos | Micorrização não uniforme, porém inóculo puro. Não adequada para fungos que não frutificam Difícil obter inóculo suficiente para aplicação em larga escala |
| Micélio vegetativo | Melhor método para boa micorrização. Difícil cultivo de algumas espécies Produção de inóculo em larga escala difícil para alguns fungos |

Na seleção de fungos (20,48), devem ser consideradas algumas características, tais como:

- facilidade de isolamento e cultivo em meios convencionais e em substratos disponíveis, a baixo custo. A maioria dos fungos ectomicorrízicos é de crescimento lento, razão pela qual é preferível selecionar os fungos que apresentem maiores taxas de crescimento;
- eficiência do fungo, com relação à capacidade de formar micorrizas;
- competitividade na interação desse fungo com a microbiota nativa do solo;
- baixa especificidade para o conjunto de hospedeiros importantes na região;
- adaptabilidade às condições climáticas e edáficas na região; e
- eficiência na promoção do desenvolvimento da planta.

PRODUÇÃO DE INOCULANTES

Previamente à produção comercial de inoculantes, devem ser desenvolvidas pesquisas que visem, além da seleção, à definição de métodos de

produção comercial, que conduzam à obtenção de inoculantes com alto potencial de colonização para os hospedeiros envolvidos, de qualidade constante e que, após o armazenamento, não percam a eficiência.

No entanto, antes que esta atividade se desenvolva, diversos obstáculos de natureza técnica e política deverão ser transpostos. Estes incluem:

- desenvolvimento de técnicas eficientes de inoculação das mudas; e
- realização de estudos da viabilidade econômica de produção de inoculantes nas diversas regiões.

É também necessária a conscientização das empresas florestais, no sentido de uma maior integração das técnicas de produção de mudas e das técnicas que viabilizam o estabelecimento dos fungos ectomicorrízicos. É, ainda, importante o estabelecimento de uma política regulamentadora e incentivadora do uso de inoculantes de fungos micorrízicos paralelamente àquela que o Governo estabeleceu para *Rhizobium*. Este fato, associado a uma comprovação experimental da eficiência dos fungos selecionados em diversas regiões florestais no país, poderá evidenciar os benefícios derivados do uso de inoculantes.

LITERATURA CITADA

- ABELSON, P.H. Plant-fungus symbiosis. Science, Washington, 229:617, 1985.
- AGERER, R.J. Studies on ectomycorrhizae. II. Introducing remarks on characterization and identification. Mycotaxon, New York, 26: 473-492, 1986.
- AGERER, R.J. Color atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Republica Federativa da Alemanha, 1987.
- AGERER, R.J. How to characterize ectomycorrhizae. In: SYLVIA, D.M.; HUNG, L.L. & GRAHAM, J.H. eds. Mycorrhizae in the next decade - Practical applications and research priorities. Nacon 7, Gainesville, 1987.
- ALEXANDRE, I.; HOGBERG, J. & HOGBERG, P. Ectomycorrhizas of tropical angiospermae trees. New Phytol., Oxford, 102:541-549, 1986.
- BOWEN, G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. eds. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p.151-205.
- CARVALHO, E.M.S. Caracterização e classificação de ectomicorrizas de *Pinus* spp. encontradas em florestas de Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984, 52 p. (Tese de Mestrado).

8. CHILVERS, G.A. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Aust. J. Bot.*, Victoria, 16:49-70, 1968.
9. DIXON, R.K. & BUSCHENA, C.A. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Pl. Soil*, Hague, 105:265-271, 1988.
10. DOMINIK, T. Synopsis of a new classification of the ectotrophic mycorrhizae established on morphological and anatomical characteristics. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 11: 359-367, 1959.
11. DOMINIK, T. Key of ectotrophic mycorrhizae. *Folia. Forest. Pol. Serv. A.*, 15:309-321, 1969.
12. DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, E.F. *Écologie microbienne du sol*. Masson, Paris, 1970.
13. DUDRIDGE, J.A.; MALIBARI, A. & READ, D.J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, London, 287-834, 1980.
14. FRANCE, R.C. & REID, C.C.P. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of the ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 61:964-984, 1982.
15. HARLEY, J.L. *The biology of mycorrhiza*. Leonard Hill, London, 1969.
16. HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, 1983.
17. HO, I. & ZAC, B. Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 57:1203-1205, 1978.
18. JEFFRIES, P. Use of mycorrhizae in agriculture. *CRC Crit. Rev. Biotech.*, 5:319-357, 1987.
19. JONES, M.M. & HUTCHINSON, T.C. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytol.*, Oxford, 102:429-444, 1986.
20. KASUYA, M.C.M. Seleção de fungos ectomicorrízicos para utilização em programas de micorrização controlada em *Pinus*: Estudos ecológicos e fisiológicos em síntese "in vitro". Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988, 61 p. (Tese de M.estrado).
21. KRUGNER, T.L. & TOMAZELLO-FILHO, M. Ocorrência de micorrizas em espécies de *Pinus* e identificação dos fungos associados. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, Piracicaba, 1981, 7 p. (Circular Técnica).
22. LE TACON, F.; GARBAYE, J. & CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. *Symbiosis*, 3:179-206, 1987.
23. MARKS, G.C. & FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. eds. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. Academic Press, London, 1973.

24. MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press., London, 1973.
25. MALLOCH, D.W.; PIROZINSKI, K.A. & RAVEN, P.H. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Washington, 77:2113-2118, 1980.
26. MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Annu. Rev. Phytopath.*, Palo Alto, 10:429-454, 1972.
27. MARX, D.H. Mycorrhizae and feeder root diseases. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. eds. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press, New York, 1973, 351 p.
28. MELIN, E. Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Palo Alto, 4:325-346, 1953.
29. MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. eds. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press, New York, 1973, p. 43-78.
30. MEYER, F.H. Physiology of mycorrhiza. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Palo Alto, 25:257-286, 1974.
31. MIKOLA, P. (ed.) *Tropical mycorrhiza research*. Oxford, Clarendon Press, Oxford, 1980.
32. MOLINA, R. & PALMER, S.G. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: SCHENCK, N.C. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, Phytopathol Soc., Minnesota, 1982. Cap. 11.
33. MOSSE, B., STRIBLEY, D.P. & LETACON, F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Adv. Microbial Ecology*, New York, 5:137-210, 1981.
34. MOUSAIN, D. Quelques aspects physiologiques et ecologiques de la symbiose ectomycorricienne. *Academie D'Agar de France*, 20 Out., 1982. pp. 1153-1161.
35. NG, P.P., COLE A.L.J., JAMESON, P. & McWHA, J.A. Cytokinin production by ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.*, Oxford, 191:57, 1982.
36. PARKE, J.L.; LINDERMAN, R.G. & BLACH, C.H. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytol.*, Oxford, 95:83, 1983.
37. RIFFLE, J.W. & MARONEWK, D.M. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies. In: SCHENCK N.C. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, Phytopatol. Soc., Minnesota, 1982, p.147-155.
38. RUEHLE, J.L. & MARX, D.H. *Fiber, food, and fungal symbyonts*. Science, Washington, 206:419-422, 1979.

39. SCHWAN, K.R.F. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiros e florestas de *Eucalyptus* spp. na região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1984. 55p. (Tese M.S.)
40. SCHENCK, N.C. Introduction. In: SCHENCK, N.C. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, Phytopathol. Soc., p IX e X. 1982.
41. SLANKIS, V. Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: G. C. MARKS, & T.T. KOZLOWSKI, (eds) *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press, New York. p. 207-230. 1973.
42. SLANKIS, V. Soil Factors influencing formation of mycorrhizas. *Annu Rev Phytopathol.*, Palo Alto, 12:437-510, 1974.
43. SMITH, S.S.E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol Rev.*, London, 55:475-510, 1980.
44. TOMAZELLO FILHO, M. & KRUGNER, T.L. Formação de ectomicorrizas e crescimento de mudas de *Pinus caribaeae* var. bahamensis em solo de viveiro infestado artificialmente com *Telephora terrestris* e *Pisolithus tinctorius* no litoral sul da Bahia. Piracicaba, Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. 21:21-37, 1980.
45. TOMAZELLO FILHO, M. & KRUGNER, T.L. Aspectos de associação micorrizica em *Pinus* spp. Piracicaba - SP. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. 1982. 32 p. (Serie Técnica, IPEF v.3 n.9).
46. THOMAZINI, L.I. Mycorrhiza in plants of the "cerrado". *Pi. Soil*, Hague, 41:707-711, 1974.
47. TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.*, New York, 28:538-606, 1962.
48. TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annu Rev Phytopathol.*, Pato Alto 15:203-222, 1977.
49. VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch em meio de cultura e na infecção micorrizica de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden em condições controladas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1984.
50. ZAK, B. Characterization and identification of douglas-fir mycorrhizae. In: HACSKAYLO, E. *Mycorrhizae*. U.S. Government Printing Office, Washington, p.38-53, 1971.
51. ZAK, B. Classification of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. eds. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. New York, Academic Press. p.43-78, 1973.
52. YOKOMIZO, N.K.S. Associação ectomicorrizica de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch com espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. Piracicaba, São Paulo. 1981. 54 p. (Tese M.S.).

O ENXOFRE E SUAS TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS

Oswaldo Garcia Jr.⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

O enxofre é um elemento essencial para todos os seres vivos. Além de sua importância na constituição de proteínas, pela presença nos aminoácidos cisteína, cistina e metionina, e também em moléculas importantes no metabolismo celular, como acetilcoenzima-A, NADH desidrogenase, ferredoxina, etc., o enxofre em seus estados reduzidos (S^{2-} , S^0) é fonte de energia para algumas bactérias quimiolitotróficas, e em seu estado oxidado (SO_4^{2-}) é receptor de elétrons oriundos do metabolismo respiratório de bactérias redutoras de sulfato.

O enxofre é o décimo elemento em abundância na crosta terrestre, embora sua presença seja de cerca de 0.05% do total. A participação microbiana na reciclagem do enxofre será agora examinada.

O ENXOFRE NO SOLO

O enxofre pode ocorrer no solo nas suas formas orgânicas e inorgânicas, sendo que a predominância de uma ou outra forma dependerá das condições ambientais, as quais determinarão a composição e o grau de atividade da microbiota transformadora. Assim, em solos férteis a predominância é das formas orgânicas, enquanto em solos áridos as formas inorgânicas predominarão.

⁽¹⁾ Departamento de Bioquímica. Instituto de Química - UNESP - Araraquara, São Paulo.

O enxofre inorgânico pode se apresentar em vários estados de oxidação, tais como, 2⁻, 0, 2⁺, 4⁺ e 6⁺ com predominância dos estados 2⁻, 0 e 6⁺ nas formas de sulfetos, enxofre elementar e sulfatos, respectivamente. Enquanto os sulfetos metálicos são praticamente insolúveis em água, e portanto pouco acessíveis aos microrganismos, os sulfatos, com algumas exceções (CaSO₄, BaSO₄), são virtualmente solúveis em água. Como será visto posteriormente, somente alguns microrganismos metabolizam os sulfetos metálicos, transformando-os em sulfatos solúveis.

O enxofre é adicionado ao solo na forma de resíduos de animais ou vegetais, fertilizantes químicos, água de chuva ou intemperização das rochas a partir de minerais sulfetados ou sulfatados primários (FeS₂, ZnS, CaSO₄).

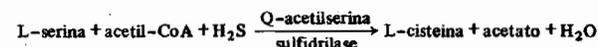
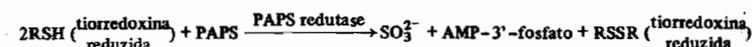
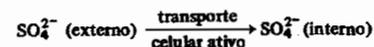
Estima-se que 90 x 10⁶ toneladas de enxofre na forma H₂S são liberadas anualmente para a atmosfera pela atividade de microrganismos. Cerca de 50 x 10⁶ toneladas são liberadas na forma de SO₂ pela queima de combustíveis. Essas formas de enxofre retornam aos solos na forma de H₂SO₄ pela chamada "chuva ácida", a qual acarreta sérios problemas sobretudo em regiões altamente industrializadas (13).

Em linhas gerais, podem-se resumir as transformações do enxofre conforme o esquema da figura 1. O desenvolvimento dos microrganismos nos diversos passos da transformação do enxofre na natureza é de fundamental importância na reciclagem desse elemento. Além disso, um dos processos de transformação de formas reduzidas de enxofre, especificamente a oxidação de sulfetos metálicos por bactérias do gênero *Thiobacillus*, se constitui na base do processo biotecnológico conhecido como "lixiviação bacteriana de metais", utilizada em escala industrial.

REDUÇÃO E ASSIMILAÇÃO MICROBIANA DO ENXOFRE

Normalmente o enxofre inorgânico é assimilado como sulfato por microrganismos e também por formas superiores de vida. Entretanto, o sulfato, que apresenta o enxofre na sua forma mais oxidada (S⁶⁺), sofre uma série de transformações para ser incorporado ao material celular na sua forma reduzida, na qual o enxofre apresenta valência 2⁻ (6).

Os passos dessas transformações têm sido estudados em várias espécies de microrganismos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* e *Aspergillus niger*. Em linhas gerais o enxofre na forma de sulfato é reduzido a sulfeto o qual reage com serina para formar cisteína. Conforme Gottschalk (8) pode-se resumir essa redução e incorporação do enxofre, segundo as reações a seguir:



O passo inicial da ativação do sulfato pelo ATP para formar APS (adenosina-5'-fosfossulfato) é provavelmente o mesmo em todos os microrganismos. Algumas variações nos demais passos, sobretudo em algas, têm sido descritas (9). O outro aminoácido sulfurado, a metionina, é formado a partir da homoserina que doa o esqueleto de carbono e da cisteína que contribui com o enxofre. Outras formas de enxofre, menos oxidadas que o sulfato, também podem ser reduzidas por microrganismos (9).

A redução e a assimilação de sulfato por microrganismos contribuem muito pouco para a liberação de H₂S para o ambiente. Essa contribuição é muito mais significativa com os microrganismos redutores de sulfato, que o utilizam como aceptor final de elétrons. Nesse caso o H₂S é liberado para o ambiente, como será visto posteriormente.

Entretanto, a importância dessa imobilização (temporária) do enxofre é inegável, pois após a morte desses organismos, a matéria orgânica será decomposta e o enxofre será reciclado.

DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO ENXOFRE ORGÂNICO

Como pode ser visto na figura 1, o enxofre entra no solo na forma de resíduos orgânicos (restos de animais e vegetais), fertilizantes, efluentes industriais, água de chuva, etc. No caso de água de chuva, o enxofre provém da emissão de H₂S pelo metabolismo microbiano ou do SO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis. A ação microbiana assimiladora e redutora do sulfato

toras de sulfato em condições extremas: pH de 4.2 a 10.4; Eh de +350 a -500 mV; salinidade 1% à saturação de NaCl (14).

Poucos compostos orgânicos servem como substrato oxidável para as bactérias redutoras de sulfato. Lactato, piruvato e malato estão entre os principais substratos utilizados. A utilização de hidrocarbonetos como substrato tem sido também relatada e assume uma especial importância em ambientes contendo depósitos petrolíferos.

Na biogênese de minerais sulfetados (FeS₂, CuS, CuFeS₂, ZnS), bem como na degradação de minerais sulfatados (MgSO₄, CaSO₄) e, também na formação de depósitos de enxofre (S⁰), parece inegável a participação desse tipo de bactéria. Destaca-se que estudos em escala de laboratório demonstram a possibilidade de se obter enxofre nativo (S⁰) a partir de sulfato, com a participação de *Desulfovibrio* na redução de SO₄²⁻ a S²⁻. Posteriormente, *Chlorobium* ou *Chromatium* (outras bactérias do ciclo do enxofre) podem oxidar o S²⁻ a S⁰, durante o processo de fotossíntese (5).

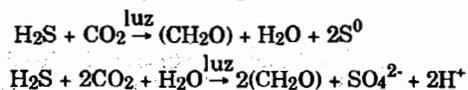
A importância ambiental das bactérias redutoras de sulfato é destacada por Postgate (12), que enumera uma série de efeitos do metabolismo dessas bactérias: poluição, corrosão, iogênese e degradação de depósitos minerais, envolvimento na indústria petrolífera (corrosão e degradação de hidrocarbonetos), tratamento de efluentes, etc.

OXIDAÇÃO MICROBIANA DE COMPOSTOS INORGÂNICOS DE ENXOFRE

Dois principais tipos de bactérias do enxofre podem oxidar formas reduzidas de enxofre inorgânico, tais como S²⁻, S₂O₃²⁻, S⁰, etc.: a) Bactérias fotolitotróficas e b) Bactérias quimiolitotróficas.

Dois gêneros principais constituem os representantes do primeiro grupo: *Chlorobium* e *Chromatium*. Esses microrganismos fotolitotróficos são anaeróbios estritos e conhecidos respectivamente como "bactéria-verde do enxofre" e "bactéria-púrpura do enxofre" (11). Em seus metabolismos, o sulfeto serve como doador de elétrons para a realização do processo fotossintético. Elas necessitam desse poder redutor para fixar o CO₂.

Desse processo resulta a formação de S⁰, o qual é normalmente depositado intracelularmente (bactéria-púrpura) ou extracelularmente (bactéria-verde). Em condições de deficiência de H₂S, o enxofre pode ser oxidado a SO₄²⁻. As equações abaixo sintetizam esse tipo de metabolismo.



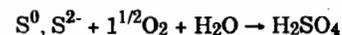
O segundo tipo de bactérias oxidantes de formas reduzidas de enxofre, as quimiolitotróficas, são os *Thiobacilli* (16). Além de sua importância ecológica na reciclagem do enxofre, algumas espécies são de reconhecida importância biotecnológica. Devido ao seu tipo de metabolismo, essas espécies são utilizadas em escala industrial, em processos de solubilização de metais de interesse econômico, como por exemplo o cobre e o urânio (2,15,10).

Esse gênero tem como característica básica a capacidade de obter energia para fixar o CO₂ atmosférico, a partir da oxidação das formas reduzidas de enxofre. Devido às peculiaridades das várias espécies deste gênero, os *Thiobacilli* podem ocupar uma razoável variedade de habitats. Assim, *Thiobacillus thioparus* utiliza o enxofre (sulfetos, tiosulfato, enxofre nativo, etc.) em ambientes de pH próximos à neutralidade. Por outro lado, *Thiobacillus thiooxidans* tem seu crescimento acelerado em condições ácidas (pH < 2.0) e são organismos mesófilos (< 40° C). Um novo gênero de bactérias oxidantes de enxofre, *Sulfolobus*, cresce em pH baixo (< 2.0) e em temperaturas de 70 a 75° C (3).

Sob o ponto de vista tecnológico, duas espécies do gênero *Thiobacillus* podem ser destacadas: *Thiobacillus thiooxidans* (17) e *Thiobacillus ferrooxidans* (4). A lixiviação (solubilização) de metais de grandes pilhas de rejeitos minerais produzidas em unidades mineradoras era considerada até por volta de 1950 como um processo natural. Com o isolamento e purificação do *Thiobacillus ferrooxidans*, foi possível correlacionar definitivamente o processo à participação bacteriana.

O princípio desse processo que é utilizado em escala industrial em vários países (nos EUA, cerca de 20% da produção anual de cobre, ou seja 200.000 t, são obtidas por este processo) baseia-se na capacidade de produzir ácido sulfúrico juntamente com outro agente oxidante (íons Fe³⁺, no caso do *T. ferrooxidans*) que promovem a lixiviação ácida de metais.

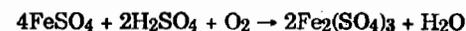
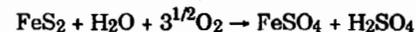
O *Thiobacillus thiooxidans* somente oxida formas reduzidas de enxofre, conforme a equação resumida abaixo:



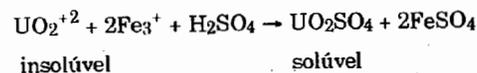
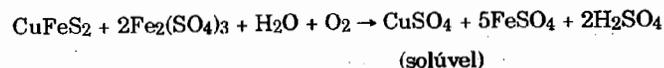
Além de oxidar o enxofre, o *Thiobacillus ferrooxidans* utiliza também o íon Fe²⁺ como substrato oxidável, transformando-o em Fe³⁺



Em ambientes contendo sulfetos metálicos, ocorre a oxidação desses minerais e a consequente solubilização dos metais presentes. Para a pirita, tem-se:



O ácido sulfúrico e o sulfato férrico produzidos podem atacar um outro sulfeto metálico ou um mineral contendo o metal em seu estado reduzido. Por exemplo:



O sulfato ferroso (FeSO_4) gerado na oxidação do urânio (U^{4+}), poderá ser novamente oxidado a sulfato férrico (Fe^{3+}), o qual oxidará U^{4+} até U^{6+} , tornando-o solúvel.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reciclagem do enxofre na biosfera é de fundamental importância para todos os organismos. Os microrganismos responsáveis pelo ciclo do enxofre devem, portanto, merecer um significativo interesse científico. Além dessa razão básica, outros fatores justificam plenamente esse interesse. A inegável influência que tais microrganismos exercem na estrutura dinâmica e evolutiva do ambiente, poderá ser comprometida pela ação cada vez mais intensa e desordenada do homem na natureza.

O aprofundamento dos conhecimentos sobre esses microrganismos não só permitirá um comportamento mais racional do homem frente ao ambiente, como também poderá proporcionar um melhor aproveitamento dos eventuais produtos desse metabolismo. Como foi visto, alguns tipos de mecanismos microbianos em relação ao enxofre levam à produção de materiais de interesse tecnológico. Outros tipos podem determinar processos corrosivos, tendo portanto também interesse econômico. No que se refere à agricultura, é patente a importância dos microrganismos na reciclagem do enxofre, pois uma disponibilidade adequada das formas assimiláveis desse elemento pelos vegetais depende fundamentalmente da atividade microbiana no solo.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, N. York, 1961. p. 374.
2. BRIERLEY, C. L. Microbiological mining. Scientific American, 71:42-51. 1982.

3. BROCK, T. D.; BROCK, K. M.; BELLY, R. T. & WEISS, R. L. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch. Mikrobiol., New York, 84:54-88, 1972.
4. COLMER, A. R.; TEMPLE, K. L. & HINKLE, M. R. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. Jour. of Bacteriol., Baltimore, 59:317-328, 1950.
5. CORK, D. J. & CUSANOVICH, M. A. Sulfate decomposition: a microbiological process. In: MURR, L. E.; TORMA, A. E. & BRIERLEY J. A. eds., Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press, N. York, 1978. pp. 207-221.
6. ERLICH, H. L. Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc., New York, 1981. p. 251.
7. FRENEY, J. R. Sulfur containing organics. In: McLAREN, A. D. & PETERSEN, G. H. eds., Soil Biochemistry. Marcel Dekker, N. York, 1967. pp. 229-259.
8. GOTTSCHALK, G. Bacterial metabolism. In: STAR, M. P., ed. Springer-verlag, New York, 1979. p. 39.
9. KROUSE, H. R. & McCREADY, R. G. L. Reductive reactions in the sulfur cycle. In: TRUDINGER, P. A. & SWAINE, D. J. eds., Biogeochemical Cycling of Mineral-forming Elements. Series: Studies in Environmental Science (vol. 3), Elsevier, Amsterdam, 1979. pp. 315-368.
10. LUNDGREN, D. G. & SILVER, M. Ore leaching by bacteria. Ann. Rev. Microbiol., Washington, 34:263-283, 1980.
11. PFENNIG, N. Phototrophic green and purple bacteria: a comparative, systematic survey. Ann. Rev. Microbiol., Washington, 31:275-290, 1977.
12. POSTGATE, J. R. Economic importance of sulphur bacteria. Phil. Trans. R. Soc. Lond., Washington, B 298, 583-600, 1982.
13. STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L. & PAINTER, P. R. The microbial World. Prentice-Hall, New Jersey, 1986. P. 554. 5a. ed.
14. TRUDINGER, P. A. The biological sulfur Cycle. In: TRUDINGER, P. A. & SWAINE, D. J. eds., Biogeochemical Cycling of Mineral-forming Elements. Series: Studies in Environmental Science (vol. 3), Elsevier, Amsterdam, 1969. pp. 293-313.
15. TUOVINEN, O. H. & KELLY, D. P. Use of microorganisms for the recovery of metals. Internat. Metall. Rev., Bedford, 19(179):21-31, 1974.
16. VISHNIAC, W. V. & SANTER, M. The Thiobacilli. Bacteriol. Rev., Baltimore, 21:195-213. 1957.
17. WAKSMAN, S. A. & JOFFE, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II - *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur oxidizing organism isolated from the soil. Jour. of Bacteriol., Baltimore, 7(2): 239-225. 1922.

TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DE OUTROS ELEMENTOS (Potássio, Micronutrientes e Metais Pesados)

Mariangela Hungria⁽¹⁾ & Segundo Urquiaga⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Os microrganismos, como membros produtores, transportadores e consumidores do ecossistema do solo, estão envolvidos no fluxo de energia e na ciclagem dos elementos, podendo alterar fortemente a sua disponibilidade. As pesquisas, entretanto, têm focado principalmente o papel dos microrganismos nas transformações do C, N e P. Isso pode ser explicado pelo fato de que o K não pode sofrer a maioria das reações que ocorrem com os outros nutrientes e, também, porque até pouco tempo atrás, foi dada pouca importância aos micronutrientes, elementos tóxicos e elementos raros. Com a intensificação da agricultura, porém, surgiram os problemas de deficiência de micronutrientes, particularmente nos solos de baixa fertilidade ou de fertilidade marginal. Por outro lado, com o incremento no uso de insumos agrícolas, iniciaram-se os relatos de acúmulo no solo e na água de elementos tóxicos, como: As, Hg, Pb ou mesmo Cu, Zn e Mn, introduzidos juntos com os pesticidas; Cu, Ni, Pb e U que podem acompanhar os fertilizantes e corretivos; diversos outros elementos podem também ser introduzidos por esgotos domésticos ou de fábricas e por alguns microrganismos. Intensificaram-se, ainda, os estudos sobre a extração de elementos raros presentes no solo.

De um modo geral, a ciclagem dos elementos a serem discutidos neste capítulo pode estar numa das seguintes categorias:

⁽¹⁾ EMBRAPA/CNPBS, Km 47 da antiga rodovia Rio-São Paulo, CEP 23.851, Seropédica, RJ.

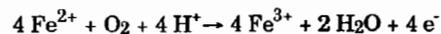
- a) conversões de oxidação ou de redução das formas inorgânicas. Normalmente a oxidação é catalisada por bactérias quimiolitotróficas;
- b) conversões da forma inorgânica para orgânica (imobilização) e da forma orgânica para a inorgânica (mineralização), e
- c) transformações indiretas resultantes da atividade metabólica dos microrganismos, alterando o pH, a pressão parcial de O₂, etc.

FERRO

O ferro (Fe) é um micronutriente importante que, embora esteja presente no solo em quantidades elevadas, muitas vezes se encontra em forma não disponível às plantas, havendo relatos, mesmo em solos brasileiros, de deficiência desse nutriente. As transformações microbianas de minerais metálicos, principalmente aqueles contendo Fe, assumem, assim, um papel importante na disponibilidade deste elemento. Podemos dividir as transformações do Fe por microrganismos em 4 classes, descritas a seguir:

OXIDAÇÃO DO ÍON FERROSO A ÍON FÉRRICO

Certas bactérias podem oxidar o íon ferroso ao estado férrico. Essa reação de oxidação pode ser representada pela equação:



Íon ferroso

Íon férrico

Alguns autores preconizam que a oxidação do íon ferroso ocorre facilmente em termos físico-químicos, o que indica que a ação dos microrganismos não deve ser relevante.

A oxidação biológica, porém, ocorre rapidamente em valores de pH entre 2,0 e 4,5, enquanto que a oxidação química nessa faixa de pH é muito lenta, apresentando seu pH ótimo próximo da neutralidade. Após a oxidação, o íon férrico, que é muito menos solúvel, precipita como hidróxido férrico, Fe(OH)₃. Várias bactérias são capazes de promover essa oxidação. *Thiobacillus ferrooxidans* é muito estudado devido a sua vasta distribuição, ocorrendo desde em regiões do fundo do mar até em rochas desérticas e sendo muito comum em solos sulfatados ácidos, bem como minas de carvão e urânio. Essa bactéria, por ser quimiolitotrófica, pode obter energia pela oxidação tanto do S, como do Fe (5).

Nos locais ricos em piritita e marcassita (FeS₂), estas são rapidamente oxidadas pelo *Thiobacillus*, produzindo minerais do tipo jarosita

(KFe₃(OH)₆(SO₄)₂). É possível que outros sulfatos férricos básicos também se formem, dependendo das argilas e cátions disponíveis no local (12). *Leptospirillum* e *Sulfolobus* são outros gêneros associados com a oxidação do Fe, além de alguns microrganismos quimiorganotróficos, os quais obtêm pouca ou nenhuma energia desse processo.

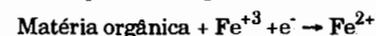
Algumas bactérias são capazes de oxidar os íons ferrosos (embora geralmente não obtenham energia pelo processo de oxidação) e depositar hidróxidos de Fe em estruturas externas às células. Essas bactérias foram denominadas de "bactérias do ferro" e pertencem aos gêneros *Gallionella*, *Crenothrix*, *Leptothrix*, *Siderocapsa*, *Sphaerotilus*, *Clonothrix*, *Metallogenium* e às bactérias filamentosas, *Pedomicrobium* e *Hyphomicrobium*, entre outros gêneros (7). Algumas dessas bactérias podem ser reconhecidas facilmente pela morfologia de suas estruturas externas incrustadas de metais. Hoje, apesar das dificuldades que envolvem esses estudos, já foram identificados, sob condições ambientes e de laboratório, diversos fungos, algas e protozoários que também depositam hidróxido férrico em polímeros extracelulares, que podem ser complexos protéicos, protéico-lipídicos ou polissacarídico-ácidos (18). Também é possível que alguns hidróxidos de Fe com carga, como o Fe(OH)₂⁺, possam se ligar aos polímeros com carga negativa produzidos por esses microrganismos e, depois, essa deposição continuaria biológica e abiologicamente. Alguns destes microrganismos têm vasta distribuição e estão sempre associados a depósitos de Fe e Mn e também podem conter outros metais de grande importância econômica (6,7).

As reações de oxidação pelo *Thiobacillus* produzindo H₂SO₄, têm importância econômica e ecológica, pois dificultam a recuperação agrícola de alguns solos, o reflorestamento em áreas de minas e a construção de edifícios devido ao grande poder de corrosão (9). A importância da oxidação também está ligada à lixiviação biogeoquímica de metais raros, como o urânio e ouro, associados aos minerais que contêm Fe. Finalmente, as bactérias que precipitam o hidróxido de ferro podem acumular os precipitados e entupir os encanamentos e depósitos de água, alterando a cor e paladar da água para o consumo.

Pelo fato de que a maioria dos solos contém quantidades reduzidas de S, a formação de H₂SO₄ ocorre em baixos níveis, normalmente não afetando o pH do solo.

REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO A ÍON FERROSO

Alguns microrganismos podem promover a redução do Fe³⁺, numa reação que pode ser representada por:



Nos solos bem aerados, a maior parte do Fe está no estado oxidado, mas, quando têm início condições anaeróbicas, aumenta rapidamente a concentra-

e condições anaeróbias. Em pH acima de 8,0, o Mn é oxidado espontaneamente, formando óxidos inertes, não disponíveis às plantas. Devido à pequena porcentagem de Mn nas células microbianas, considera-se a imobilização desprezível, e a oxidação e a redução são, portanto, os principais processos.

OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DO Mn^{2+}

A oxidação biológica do Mn^{2+} tem importância entre pH 5,5 e 9,0 e é mais rápida em valores próximos da neutralidade. Abaixo de pH 8,0 há pouca oxidação química. A oxidação do Mn^{2+} ocorre tanto na superfície do mar como no solo, e os óxidos produzidos microbiologicamente parecem apresentar uma forma intermediária entre a tri e tetravalente, mas pouco se sabe sobre o aproveitamento pelas plantas dessas formas intermediárias. Já foram identificados diversos gêneros de bactérias capazes de realizar a oxidação, tais como: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Metallogenium*, *Pedomicrobium* e os fungos *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia* e *Fusarium* (1).

As "bactérias do ferro", já discutidas anteriormente, também podem oxidar o Mn^{2+} e depositar MnO_2 em polissacarídeos extracelulares (7).

A oxidação microbiológica do Mn^{2+} pode ocorrer indiretamente pela produção de substâncias que alteram o pH. Grande parte dos relatos de oxidação, porém, parecem estar diretamente relacionados a mecanismos de proteção contra toxidez de O_2 . A oxidação do Mn^{2+} com pequenas quantidades de H_2O_2 produzido durante o crescimento aeróbio pode livrar as células do H_2O_2 tóxico e a oxidação também pode substituir o papel da superóxido dismutase, na proteção contra a toxidez pelo H_2O_2 . Algumas bactérias também parecem poder obter energia útil desse processo de oxidação (25).

A proliferação dos microrganismos que oxidam o Mn^{2+} na rizosfera pode levar as plantas à deficiência desse micronutriente.

REDUÇÃO DO MnO_2 A Mn^{2+}

Esse processo é muito semelhante à redução do Fe. Pode ocorrer pela produção de ácidos, abaixamento do potencial de oxidação-redução ou remoção do O_2 pelo metabolismo microbiano, havendo então uma redução química. Mas também pode ocorrer uma redução direta, quando o MnO_2 funciona como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Diversos microrganismos, como *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e vários fungos podem realizar a redução, que aumenta consideravelmente com a adição de matéria orgânica.

BIOTRANSFORMAÇÕES DE OUTROS MICRONUTRIENTES

O zinco (Zn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e boro (B) são necessários aos microrganismos estimulando fortemente o seu crescimento, como no caso de fungos na presença de Zn. Esses micronutrientes, por estarem associados à matéria orgânica, sofrem os processos de mineralização e imobilização. Em alguns casos, a imobilização temporária desses nutrientes pode levar as plantas à deficiência (17).

Esses micronutrientes também podem sofrer transformações indiretas, tais como: a) solubilização de silicatos que contenham esses micronutrientes pela ação de ácidos orgânicos ou inorgânicos, resultantes do metabolismo microbiano; b) queda do pH resultante da oxidação do NH_4 na nitrificação ou do S pelo *Thiobacillus*, podendo favorecer a disponibilidade do Zn e Cu; e c) oxidação do S e de minerais contendo micronutrientes, como é o caso do ZnS , podendo o metal ser liberado numa forma solúvel. O Cu, porém, parece também sofrer oxidação. Na presença de Cu_2S , os íons cuprosos podem ser oxidados por *Thiobacillus ferrooxidans* numa reação enzimática, que pode sustentar o crescimento quimiolitotrófico dessa bactéria (17,22,28).

POTÁSSIO

Os minerais, particularmente os feldspatos, constituem a principal reserva de potássio (K) do solo. Nos sistemas biológicos, este nutriente só existe no estado monovalente, não ocorrendo, portanto, as reações de oxidação e redução que tipificam as transformações microbiológicas do N, S, Fe e Mn. As reações envolvendo o K podem ser classificadas como se segue.

IMOBILIZAÇÃO E MINERALIZAÇÃO

A microflora tem influência no nível de K disponível, especialmente em solos pobres, podendo competir com as plantas no caso de baixa disponibilidade do nutriente. Essa imobilização, porém, é apenas temporária e, com a morte dos microrganismos, o K é liberado das células por mineralização. Acredita-se que os microrganismos possam ser responsáveis pela mineralização de aproximadamente 1/3 da quantidade total de K contido nas células e ligado aos complexos orgânicos de plantas e microrganismos. Os outros 2/3 do K, por estarem fracamente ligados, são imediatamente solúveis, não requerendo a intervenção de microrganismos (1).

TRANSFORMAÇÕES INDIRETAS

Diversos microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) conseguem solubilizar o K através da decomposição de minerais silicatados (27). Desse modo, já foi relatado o crescimento de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium* e outros microrganismos em meio deficiente em K, mas ao qual se adicionaram silicatos de alumínio insolúveis. O K pode ser liberado de minerais como a biotita, muscovita, microclina, nefelina, leucita, ortoclásio e minerais de argila como a montmorilonita (1, 11, 13, 27).

A liberação do K desses minerais ocorre, principalmente, pela ação de ácidos produzidos pela atividade biológica. Por outro lado, a própria remoção do K solúvel pela assimilação microbiana favorece a liberação do K dos minerais, aumentando o gradiente de concentração durante a reação de hidrólise dos minerais.

TRANSFORMAÇÕES DE ELEMENTOS TÓXICOS: MERCÚRIO, CÁDMIO, CHUMBO, ESTANHO E ARSÊNIO

O mercúrio (Hg) participa de um ciclo bastante complexo na biosfera. As rochas e sedimentos marinhos contêm a maior parte do Hg da terra mas, atualmente, a atividade humana na mineração e nas indústrias adiciona quantidades consideráveis de Hg ao meio ambiente.

Alguns microrganismos realizam a *metilação* do Hg, processo este muito importante, uma vez que mobiliza o Hg dos sedimentos através da formação de monometilmercúrio (CH_3Hg^+) ou dimetilmercúrio (CH_3HgCH_3), muito tóxicos aos animais. Também há indicações de *metilação* do cádmio (Cd), chumbo (Pb), estanho (Sn) e arsênio (As), havendo a formação de compostos que, como no caso do Hg, são ainda mais tóxicos. As bactérias anaeróbias que vivem na superfície de sedimentos marinhos fazem a metilação do Hg pela excreção de metilcobalamina, que serve como doador do grupo metil. No solo, a metilação é realizada também por bactérias anaeróbias, fungos, leveduras e, possivelmente, mesmo por bactérias aeróbias, que sintetizam a vitamina B12 (cobalamina) ou que possam usá-la quando disponível, tendo sido identificadas, em laboratório, culturas de *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e dos fungos *Aspergillus*, *Neurospora* e *Scopulariopsis* com esta capacidade.

Existem diversos relatos de bactérias resistentes a teores elevados de Hg e organomercuriais. Estas bactérias possuem mecanismos de desintoxicação que podem incluir: 1) síntese de grupos tiol que se ligam ao Hg tornando-o menos tóxico; 2) barreiras de permeabilidade que limitam o acesso à célula e 3) eliminação do metal do meio de crescimento pela *redução*, chegando à volatilização

como Hg^0 . Já foram isoladas enzimas envolvidas na desintoxicação, como a redutase do Hg^{2+} e as liases.

Algumas bactérias quimiolitotróficas e quimiorganotróficas também são capazes de solubilizar os metais tóxicos contidos em minerais como o PbS e CdS (25).

O As é mais abundante do que o Hg na natureza, não havendo, entretanto, evidências de que haja bioacumulação considerável desse metalóide. Alguns microrganismos, em solos tratados com pesticidas e herbicidas, podem produzir compostos gasosos contendo As. Também já foi relatada a *oxidação* do As^{+3} a As^{+5} , que é menos tóxico. A *redução* do arsenato a arsenito já foi observada em *Chlorella*.

O FATOR BIÓTICO NAS TRANSFORMAÇÕES DE ALGUNS OUTROS ELEMENTOS

O selênio (Se) é importante porque, em baixas concentrações, tem-se mostrado estimulante para o crescimento das plantas, assim como há evidências de que seja indispensável à nutrição animal e crescimento de alguns microrganismos. Mas, em muitas situações, as plantas podem acumular níveis acima de 4 ppm, ficando tóxicas aos animais. Níveis elevados de Se também podem ser tóxicos aos microrganismos. Algumas plantas assimilam Se e quando submetidas à mineralização, poderá ocorrer a *metilação* pelos microrganismos. Também há indicações de *oxidação* do Se elementar e de *redução* do selenato e do selenito do solo por alguns microrganismos. O telúrio (Te), que pode ser muito tóxico aos microrganismos, também parece sofrer as mesmas transformações do Se (4, 25).

Uma nova bactéria, *Stibiobacter senarmontii* é capaz de oxidar o antimônio da forma Sb^{+3} a Sb^{+5} , usando essa reação aparentemente para produzir energia.

Em relação ao cálcio (Ca), a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos pelos microrganismos pode solubilizar o Ca das rochas calcárias. Em ambientes marinhos, o CO_2 preso na forma de bicarbonato de Ca é removido pelos microrganismos fotolitotróficos, precipitando então carbonato de cálcio ou, quando existirem fosfatos, fosfatos de cálcio (16).

O silício (Si) é essencial para alguns microrganismos, e pode sofrer solubilização pela ação de ácidos orgânicos e inorgânicos produzidos pelos microrganismos do solo. A atividade dos microrganismos, produzindo ácidos e agentes quelantes também pode liberar, de minerais ou sais insolúveis, o magnésio (Mg), alumínio (Al), sódio (Na) e outros elementos (11).

CONCLUSÃO

O interesse pelo papel dos microrganismos na ciclagem de outros elementos cresce, então, devido a sua importância econômica, ambiente e geoquímica. A agricultura moderna e racional exige a intensificação dos estudos sobre essas transformações, que podem provocar um aumento ou diminuição na disponibilidade tanto de nutrientes, como de elementos tóxicos às plantas, afetando diretamente o seu crescimento. Além disso, as pesquisas nessa área podem conduzir ao melhor conhecimento da fisiologia do crescimento dos microrganismos, que poderão ser usados para o controle da poluição ambiente e para a recuperação de minérios de grande valor econômico que se encontram em baixa concentração nos solos.

No Brasil, como em outros países do terceiro mundo, estes estudos são de importância ainda maior, visto que a legislação ainda permite a aplicação de elementos pesados na forma de defensivos agrícolas.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. 2. ed. New York. John Wiley Sons, 1977. 467p.
- AKERS, H.A. Isolation of the siderophore schizokinen from soil of rice fields. Appl. Environm. Microbiol. Baltimore, 45:1704-1706, 1983.
- BROMFIELD, S.M. Reduction of ferric compounds by soil bacteria. J. Gen. Microbiol., Oxford, 11:1-6, 1954.
- COLE, M.A. Solubilization of heavy metal sulfides by heterotrophic soil bacteria. Soil Sci., Baltimore, 127:313-317, 1979.
- COLMER, A.R. & HINKLE, M.E. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. Science, Washington, 106:253-256, 1947.
- EMERY, T. Iron deprivation as a biological defense mechanism. Nature, London, 287:776-777, 1980.
- GHIORSE, W.C. Biology of iron - and manganese - depositing bacteria. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 38:515-550, 1984.
- HAMMANN, R. & OTTOW, J.C.G. Isolation and characterization of iron-reducing nitrogen-fixing saccharolytic clostridia from gley soil. Soil Biol. Biochem., Oxford, 8:357-364, 1976.
- HARRISON, Jr., A.P. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 38:265-292, 1984.
- HARTMANN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum*. Pl. Soil, Hague, 1988.
- HENDERSON, M.E.K. & DUFF, R.B. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks and soils by fungal activity. J. Soil Sci., London, 14:236-246, 1973.
- IVARSON, K.C. Microbiological formation of basic ferric sulfates. Can.J. Soil Sci., Ottawa, 53:315-323, 1973.
- IVARSON, K.C.; ROSS, G.J. & MILES, N.M. Alterations of micas and feldspars during microbial formation of basic ferric sulfates in the laboratory. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 42:518-524, 1978.
- KLOEPPER, W.; LEONE, J.; TEINTZ, M. & SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, London, 286:885-886, 1980.
- KOMATSU, Y.; TAKAGI, M. & YAMAGUCHI, M. Participation of iron in denitrification in waterlogged soil. Soil. Biol. Biochem., Oxford, 10:21-26, 1978.
- LOPES, A.S. Micronutrientes nos solos e culturas brasileiras. In: Anais do Seminário P, Ca, Mg, S e Micronutrientes - Situação Atual e Perspectiva na Agricultura. São Paulo, Manah S/A, 1986. pp. 110-141.
- MCCORMICK, R.W. & WOLF, D.C. Effect of montmorillonite and trace elements on the growth of *Penicillium frequentans*: I - Ammonium nitrogen source. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 43:1114-1120, 1979.
- NEILANDS, J.B. Microbial envelope proteins related to iron. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 36:285-309, 1982.
- NEILANDS, J.B. & LEONG, S.A. Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Microbiol., 37:187-208, 1986.
- POWELL, P.E.; CLINE, G.R.; REID, C.C.P. & SZANISLO, P.J. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. Nature, London, 287:833-834, 1980.
- POWELL, P.E.; SZANISLO, P.J.; CLINE, G.R. & REID, C.P.P. Hydroxamate siderophore in the nutrition of plants. J. Plant Nutrition, New York, 5:653-673, 1982.
- RAZZELL, W.E. & TRUSSELL, P.C. Microbiological leaching of metallic sulfides. Appl. Microbiol., Baltimore, 11:105-110, 1963.
- SILVERMAN, M.P. & EHRLICH, H.L. Microbial formation and degradation of minerals. Adv. Appl. Microbiol., Madison, 6:153-206, 1964.
- SILVERMAN, M.P. & LUNDGREN, D.G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I - An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bact., Baltimore, 77:642-647, 1959.

25. SUMMERS, A.O. & SILVER, S. Microbial transformations of metals. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 32:637-672, 1978.
26. TIEDJE, J.M.; SEXSTONE, A.J.; PARKIN, T.B.; REVSBECH, N.P & SHELTON, D.R. Anaerobic processes in soil. *Pl. Soil. Hague*, 76:197.212, 1984.
27. WEED, S.B.; DAVEY, C.B. & COOK, M.G. Weathering of mica by fungi. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Madison, 33:702-706, 1969.
28. ZAJIC, J.E. *Microbial Biogeochemistry*. New York, Academic Press, 1969. 345p.

DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E SUA INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA DO SOLO

Maria Raphaela Musumeci⁽¹⁾

INTRODUÇÃO

Os defensivos agrícolas ou agrotóxicos são substâncias químicas destinadas ao controle das pragas e doenças de culturas agrícolas, que atingem o solo, não só pela incorporação direta pela superfície, como também através do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas, no controle de fungos patogênicos do solo ou da eliminação de ervas daninhas por herbicidas. Esses compostos podem ainda atingir o solo de forma indireta pela pulverização das partes verdes dos vegetais e pela queda de frutos e folhas que receberam a aplicação dos agrotóxicos e que são incorporados ao solo.

Assim, os defensivos destinam-se a, em benefício da agricultura, alterar o balanço ecológico pela eliminação das espécies indesejáveis, em favor das espécies consideradas aproveitáveis para a continuação da existência humana.

Entretanto, a própria natureza regida por tão variados processos biológicos e bioquímicos torna pouco provável que, mesmo compostos altamente específicos, não afetem outros organismos além daquele organismo ao qual se destinam, na sua tarefa de controle de uma doença, praga ou erva daninha. É, por isso, importante que o homem verifique quais as mudanças ecológicas que os defensivos podem produzir, e se essas mudanças são permanentes ou temporárias. Um perfeito conhecimento e compreensão do comportamento desses compostos nos solos e dos processos do solo que afetam os agrotóxicos, torna-se assim, necessário, se são desejáveis os métodos para controlar a persistência do defensivo e minimizar seus efeitos deletérios ao meio ambiente.

⁽¹⁾ Instituto Biológico, Caixa Postal 7119, CEP 04014, São Paulo, SP.

PERSISTÊNCIA E DEGRADAÇÃO

A duração do efeito de um pesticida e sua permanência no meio ambiente estabelecem a persistência desse composto, sendo esta influenciada pela estrutura química do composto e pelas condições ambientais. Os compostos orgânicos sintéticos podem desaparecer do solo através de vários processos, a saber: volatilização, lixiviação e reações químicas, de natureza hidrolítica ou por fotólise. Em muitas circunstâncias, porém, o desaparecimento do agrotóxico é atribuído à atividade microbiana do solo (Figura 1).

O termo degradação tem sido utilizado para a descrição de transformações de todo o tipo, incluindo aquelas que originam produtos mais tóxicos que o composto inicial, pela sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa mineralização até CO_2 , H_2O , NO_3 , etc.



Figura 1. Processos que podem afetar a persistência de pesticidas no solo.

INTERAÇÃO AGROTÓXICOS/MICRORGANISMOS

A degradação microbiana se apresenta como o fator mais decisivo no comportamento e destino dos agrotóxicos no solo. Se um composto químico é persistente, de duração temporária, ativado ou desativado, ou se vier a se constituir num problema residual, tudo isso depende muito de seu metabolismo pelos microrganismos do solo.

Embora a degradação microbiana dos xenobióticos pudesse ser uma regra na natureza, diversas características da molécula química - tais como: as ligações do cloro e dos outros halogênios, anéis aromáticos altamente condensados, ligações em seqüências terciárias ou quaternárias de átomos de carbono - são algumas das razões mais comuns para a resistência de compostos xenobióticos à biodegradação, introduzindo-se para estes compostos persistentes o termo "moléculas recalcitrantes". Ainda podem levar à persistência do agrotóxico outras razões como:

a) a inibição da síntese de enzimas de microrganismos capazes de atuarem na sua degradação;

Quadro 1. Mecanismos utilizados por microrganismos na degradação de moléculas recalcitrantes (Fuller & Warrick) (21)

| Substrato | Reação |
|---------------|--|
| Éster | $\text{RC(O)OR} \rightarrow \text{RC(O)OH}$ |
| Éter | $\text{ArOR} \rightarrow \text{ArOH}$ |
| Lig C-N | $\text{R(R')} \text{NR}'' \rightarrow \text{R(R')} \text{NH e/ou} \rightarrow \text{RNH}_2$ $\text{RN(Alq)}_2 \rightarrow \text{RNHALq e/ou} \rightarrow \text{RNH}_2$ $\text{RNHCH(R')} \rightarrow \text{RNH}_2$ $\text{RNH}_2\text{CH}_2\text{R} \rightarrow \text{RNH}_2$ |
| NOC(O)R | $\text{RCH=NOC(O)R} \rightarrow \text{RCH=NOH}$ |
| Lig C-S | $\text{RSR} \rightarrow \text{ROH e/ou HSR}$ |
| Lig C-Hg | $\text{RHgR} \rightarrow \text{RH e/ou Hg}$ |
| Lig C-Sn | $\text{R}_3\text{SnOH} \rightarrow 2\text{R}_2\text{SnO} \rightarrow \text{RSnO}_2\text{H}$ |
| C-O-P | $\text{(AlqO)}_2\text{P}^{(*)}\text{R} \rightarrow \text{AlqO(HO)P}^{(*)}\text{R e/ou} \rightarrow \text{(HO)}_2\text{P}^{(*)}\text{R}$ $\text{ArOP}^{(*)}\text{(R)R} \rightarrow \text{ArOH e/ou} \rightarrow \text{HOP}^{(*)}\text{(R)R}$ |
| P-S | $\text{RSP(O)(R')} \text{OAlq} \rightarrow \text{HOP(O)(R')} \text{OAlq}$ |
| Éster sulfato | $\text{RCH}_2\text{OS(O)}_2\text{OH} \rightarrow \text{RCH}_2\text{OH e/ou HOS(O)}_2\text{OH}$ |
| S-N | $\text{ArS(O)}_2\text{NH} \rightarrow \text{ArS(O)}_2\text{OH}$ |
| S-S | $\text{RSSR} \rightarrow \text{RSH}$ |

* = S ou O
 R = radical orgânico alifático
 Ar = aromático
 Alq = alquil
 Lig = ligação

b) uma impossibilidade do composto de penetrar na célula microbiana pela falta de enzimas adequadas;

c) insolubilidade do composto e, portanto, uma ausência de disponibilidade ao ataque do microrganismo;

d) o alto poder de adsorção do agrotóxico ao solo, ou

e) uma toxidez excessiva do composto original e de seus metabólitos iniciais.

Todavia, a atividade microbiana que utiliza para seu próprio desenvolvimento e crescimento o agrotóxico como fonte de carbono e energia ocasiona a fragmentação do composto assim utilizado até as suas partes inorgânicas, ou ainda em compostos que podem ser usados em um ciclo oxidativo como o ciclo de Krebs, removendo, dessa maneira, a toxidez potencial do agrotóxico do meio ambiente.

O fato de que os agrotóxicos possam ser utilizados pelos microrganismos do solo como fonte de carbono e de energia para o seu próprio desenvolvimento e crescimento propiciou a utilização das técnicas do enriquecimento do solo com esses mesmos compostos, para o isolamento de microrganismos atuantes nos processos de degradação de determinados compostos. Entretanto, verificou-se posteriormente que outros mecanismos, como transformações co-metabólicas, reações de conjugação e o simples acúmulo de um composto num micróbio, são importantes fatores de interferência microbiana e da remoção do agrotóxico. Portanto os principais mecanismos de detoxificação do solo compreendem:

a) Mineralização ou degradação completa, conforme já discutido.

b) Co-metabolismo - Na atividade co-metabólica (1), o microrganismo pode transformar o agrotóxico sem dele retirar energia para o seu desenvolvimento. O co-metabolismo não leva, em geral, a uma completa degradação da molécula do agrotóxico, porém causa a sua redução.

c) Conjugação - No processo de conjugação, a molécula integral do xenobiótico ou um seu metabólito se combina com compostos naturais do solo como os aminoácidos ou carboidratos. A formação do conjugado normalmente torna a molécula mais polar e assim mais hidrolisável.

d) Acúmulo - O acúmulo de agrotóxicos por microrganismos pode ocorrer por um processo ativo ou passivo e traz uma grande preocupação, uma vez que essa interferência microbiana significa apenas a remoção temporária da molécula tóxica. Compostos organoclorados como o DDT, dieldrin, aldrin e heptaclor foram detectados nas células de fungos do solo e no micélio de fungos cultivados em meio de cultura acrescidos desses compostos.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS AGROTÓXICOS NO SOLO

Nas últimas décadas, diversas técnicas se desenvolveram para tais estudos. O emprego da tecnologia nuclear, permitindo a utilização de compostos marcados associada a outras técnicas de análise, tais como a cromatografia a gás, a cromatografia em camada delgada, e a cromatografia líquida de alta pressão associada à espectroscopia de massa, tudo isso permitiu uma avaliação qualitativa e quantitativa do metabolismo de agrotóxicos no solo.

Por outro lado, a influência dos microrganismos no comportamento dos agrotóxicos vem sendo estudada pela comparação do metabolismo em amostras de solos esterilizados (por autoclavagem, radiação γ , fumigação, inibidores microbianos) e em solos naturais. A seguir, o isolamento de microrganismos efetivos na degradação e sua atuação comprovada por bioensaios (cultivo do microrganismo em meio acrescido do agrotóxico) é mais um passo na avaliação do comportamento do agrotóxico num ecossistema.

COMPORTAMENTO DE AGROTÓXICOS NO SOLO

Inseticidas organoclorados

Os inseticidas organoclorados incluem, entre outros, o DDT, aldrin, dieldrin, lindano, endosulfan, isodrin, heptaclor.

Situam-se estes compostos entre os agrotóxicos mais persistentes no meio ambiente. Reações químicas como a fotólise e também a ação microbiana em menor intensidade são os processos pelos quais esses compostos são degradados no solo.

DDT

O DDT é o pesticida mais frequentemente encontrado no meio ambiente, pois este agrotóxico apresenta uma estrutura química (Figura 2) que,

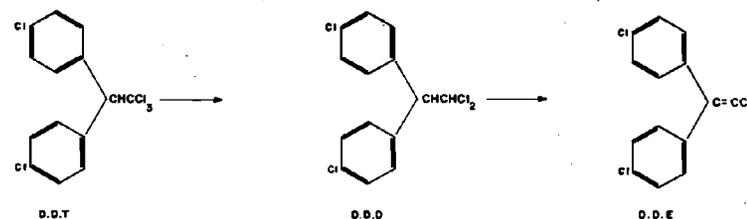


Figura 2. D.D.T. e alguns de seus metabólitos.

pela posição dos grupos clorados na molécula confere uma grande estabilidade ao composto. Os primeiros produtos de seu metabolismo são os compostos DDD e DDE, provenientes da decloração da molécula (Figura 2).

Em solos da região temperada o DDT tem uma meia-vida de cerca de três anos e, após 10 anos, cerca de 5 a 10% do aplicado ainda permanecem no solo (18).

Em experimentos realizados em laboratório, acompanhou-se o comportamento do DDT em dois tipos de solos brasileiros: o gley húmico e o latossolo vermelho-amarelo (respectivamente com alto e baixo teor de matéria orgânica). Após 256 dias da aplicação, cerca de 50% do DDT permaneciam nos dois solos, sendo o metabolismo do DDT em DDE mais aparente no solo com maior teor de matéria orgânica. A concentração de DDE nesse solo correspondeu a 1,13 mg para 0,83 mg detectadas no solo latossolo vermelho-amarelo (34).

Também a influência da umidade na degradação do DDT-¹⁴C foi estudada em solo do Cerrado de Planaltina, Distrito Federal, mantido em laboratório, com diferentes conteúdos de água. Durante um ano de observação foi constatada uma perda de 12% do DDT aplicado ao solo com umidade equivalente a 2/3 da capacidade de campo; no solo com umidade equivalente a 100% da capacidade de campo a perda correspondeu a apenas 5,3% (3).

A degradação microbiana do inseticida DDT tem sido verificada em condições anaeróbicas que favorecem os passos da decloração da molécula (23). Entretanto, nessas transformações bioquímicas, embora o DDT passe por algumas alterações, o esqueleto de carbono persiste na natureza por períodos excessivamente longos. Nessa degradação microbiana, a bactéria *Enterobacter aerogenes* leva a molécula do DDT ao metabólito DBP (4-4-diclorobenzofenona) que é ainda um composto persistente (6).

Focht e Alexander (20), por sua vez, demonstraram a mineralização *in vitro* do esqueleto de carbono, utilizando extratos celulares de uma bactéria (*Hydrogenomonas*) possuindo enzimas redutoras, ou células inteiras de *Arthrobacter*. Todavia, estes pesquisadores chegaram à conclusão de que a mineralização bioquímica do DDT no meio ambiente não ocorre, ou se estabelece numa velocidade excessivamente lenta.

Devido a sua pouca solubilidade na água, o DDT não é intensamente lixiviado dos solos. Altos valores de sorção foram determinados em diferentes amostras de solos brasileiros com diferentes propriedades físico-químicas, sendo esses altos valores de K associados ao alto teor de matéria orgânica e de argila nos solos analisados (35).

Aldrin

O aldrin, um inseticida do grupo do ciclodieno, está também entre os compostos orgânicos altamente persistentes no meio ambiente.

A oxidação é o principal mecanismo do metabolismo microbiano, embora possam também ocorrer reações de decloração, hidrólise, redução e hidroxilação. O aldrin é oxidado a dieldrin (Figura 3), que mantém ainda as propriedades inseticidas (39).

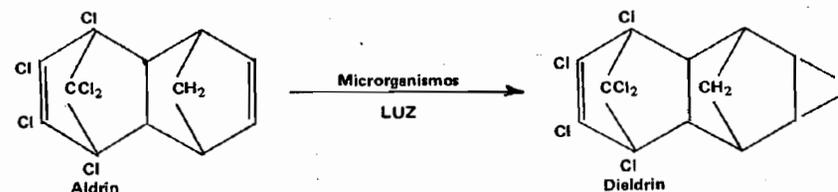


Figura 3. Degradação do aldrin em dieldrin.

Alguns microrganismos isolados do solo são capazes de oxidar o aldrin em dieldrin (52). Outros metabólitos, além do dieldrin, foram detectados, sendo um deles comparado cromatograficamente com o 6,7,trans-dihidroaldrin (37). Uma única citação de mineralização do aldrin a partir de ¹⁴C-aldrin é mencionada na literatura com liberação de ¹⁴CO₂ durante a incubação em culturas com *Trichoderma koningi*, sugerindo que uma possibilidade de fragmentação do anel possa ocorrer (12).

Verificou-se, em meio de cultura, a capacidade de fungos isolados de diferentes amostras de solos brasileiros adsorverem e degradarem o ¹⁴C-aldrin e alguns de seus metabólitos. Dos 14 fungos, isolados pertencentes a diferentes espécies do gênero *Penicillium* e *Trichoderma*, incubados por 76 dias com esses compostos, comprovou-se a incorporação em oito dos isolados de cerca de 20 a 40% da atividade total do composto adicionado ao meio. Essa retenção indicaria a possibilidade de acúmulo nas condições ambientes e também uma redução da atividade biológica desses compostos no solo (44).

A persistência e lixiviação do aldrin em dois solos brasileiros foi estudada em um solo com alto teor de matéria orgânica (gley húmico) e em outro com baixo teor de matéria orgânica, (latossolo vermelho-amarelo). Um ano após a aplicação recuperaram-se 30% do ¹⁴C no solo gley húmico nos primeiros 10 cm superiores, enquanto que no solo pobre em matéria orgânica, somente 8% permaneciam entre os 20 cm superiores (24). Embora o metabólito dieldrin tenha sido detectado nos dois solos, o metabolismo foi mais acentuado no solo gley húmico (24).

Lindano

O lindano é o produto técnico que contém mais de 99% do isômero gama do BHC (hexaclorociclohexano). É o menos persistente dos inseticidas

organoclorados no solo, sendo extremamente volátil, havendo uma grande perda quando aplicado ao solo, em consequência da volatilização. Cerca de 20% do lindano aplicado ao solo foram perdidos em 40 dias (32).

Experiências realizadas em países de clima temperado constataram que, num solo húmico-argiloso, após 3 anos da aplicação cerca de 10 a 14% do lindano estavam presentes no solo, enquanto que, em um solo arenoso, cerca de 10% do composto ainda permaneceram após 14 anos (53).

Foi observada uma degradação do lindano em consequência da atividade microbiana, com uma dehidrohalogenação da molécula levando ao γ -pentaclorociclohexano, metabólito sem atividade inseticida (Figura 4). Como microrganismos envolvidos na degradação do lindano foram isoladas as bactérias *Bacillus coli*, *Bacillus cereus* e também o anaeróbio *Clostridium*, nesse caso isolado de solos inundados (47,53).

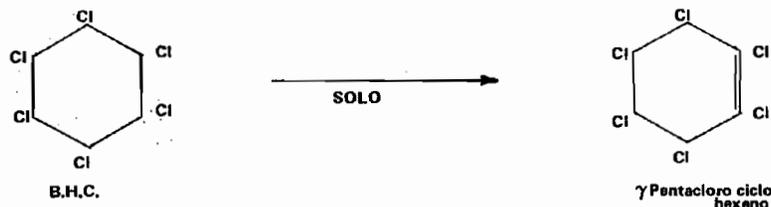


Figura 4. Degradação microbiana do γ B.H.C..

Inseticidas carbamatos

Normalmente, os compostos do grupo dos carbamatos têm uma persistência muito reduzida no solo, sendo facilmente degradados por diversos microrganismos.

Como principais mecanismos da degradação dos metilcarbamatos no solo, são citadas a hidrólise e a hidroxilação do anel aromático ou dos grupos alquilas.

Carbaril

Entre os inseticidas do grupo dos metilcarbamatos, situa-se o carbaril, cujo comportamento no solo tem sido muito estudado. Alguns estudos têm atribuído ao carbaril uma meia-vida de 7 dias (29).

A degradação do carbaril é influenciada, em solos pobres em matéria orgânica (latossolo vermelho-amarelo), pela adição de sacarose a esse solo em ensaios efetuados em laboratório. Após seis semanas nos solos enriquecidos,

todo o carbaril havia sido degradado, provavelmente devido a um acréscimo da atividade microbiana no solo originalmente pobre em matéria orgânica (27). Nesse mesmo solo, sem adição de nutrientes, o carbaril foi ainda detectado após 10 semanas. A mineralização do carbaril foi também favorecida, no solo pobre em matéria orgânica, pela adição dessa fonte de carbono, sendo constatada, após 21 dias, uma liberação do CO_2 , cerca de 20 vezes maior do que a liberação em latossolo vermelho amarelo não enriquecido (15,27).

Diversos microrganismos capazes de degradar o carbaril foram isolados de diferentes tipos de solos. Entre esses citamos os fungos *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Gliocladium roseum* e as espécies de *Mucor* e *Penicillium* (13) e diferentes espécies da bactéria *Pseudomonas* (31) (Figura 5).

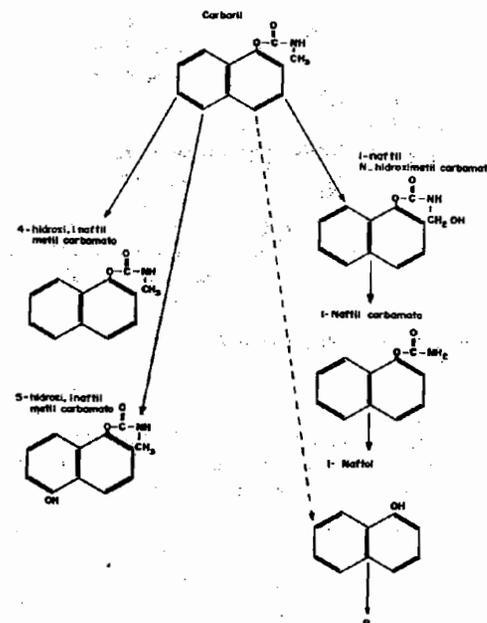


Figura 5. Degradação do Carbaril através do fungo *Aspergillus terreus* (Bollag & Liu, 13).

Inseticidas fosforados

Em relação aos organoclorados, os inseticidas organofosforados são bem menos persistentes no solo, sendo a meia-vida desses compostos expressa em semanas ou até em horas.

Embora a persistência desses compostos seja curta, há uma grande preocupação com relação aos metabólitos desenvolvidos, derivados do grupo oxon dos inseticidas tiofosforados e que são também inibidores da atividade colinesterásica (17). Assim são particularmente danosos o metabólito maloxon, derivado do malation, e o paroxon proveniente da degradação do paration.

Malation

Entre os menos persistentes desses inseticidas situa-se o malation que é inicialmente sujeito à hidrólise química, antes mesmo de ser degradado por microrganismos (Figura 6).

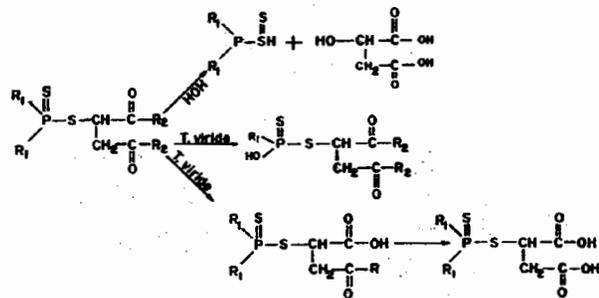


Figura 6. Degradação do malation no solo por *Trichoderma viride*

A meia-vida do malation é de 16 horas em um solo latossolo roxo, e de 24 horas para um solo do tipo arenoso, ocorrendo após 4 dias a decomposição completa do composto nos dois solos (25).

A ação de microrganismos do solo na degradação do malation foi estudada por Matsumura e Boush (36) em três tipos de solos, dos quais foram isolados uma bactéria *Pseudomonas* e o fungo *Trichoderma viride*. Os metabólitos identificados foram o desmetil malation, as formas ácidas do malation (monoácido e diácido) e o ácido dimetilfosfórico. Outros microrganismos como *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Aspergillus*, quando incubados com o malation, degradaram esse inseticida, originando metabólitos semelhantes (40).

Paration

Um dos principais produtos da degradação do paration no solo, o amino paration é desenvolvido principalmente pela ação redutora de alguns

fungos. O outro metabólito de paration, o p-nitrofenol, é produzido, ou por hidrólise química, ou pela ação hidrolítica de bactéria (Figura 7).

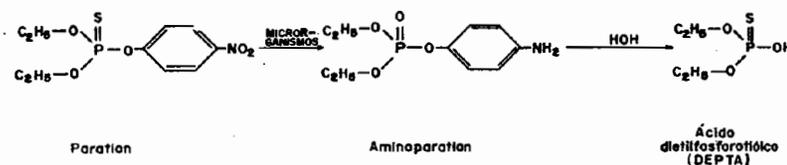


Figura 7. Degradação do paration no solo.

A meia-vida do paration em solo gley húmico é de cerca de duas semanas (2). Aplicações repetidas de paration em solo gley húmico não proporcionam uma degradação mais rápida do mesmo, sendo a velocidade da mineralização (liberação do CO₂ do composto) a mesma, tanto no solo que recebeu 10 aplicações sucessivas do paration, como nas amostras de solo sem aplicações repetidas do pesticida (5). Os autores isolaram do solo tratado com aplicações repetidas de paration um actinomiceto, *Nocardia* sp., que não foi contudo detectado nas amostras do solo sem aplicações repetidas, e que degradou *in vitro* o paration no seu metabólito, o nitrofenol (5).

A degradação microbiana do paration no solo foi também observada por Lichtenstein e Schulz (33), com identificação do metabólito amino paration. Posteriormente (30), foi verificado que, em condições de baixa disponibilidade de O₂, o grupo amino desse metabólito pode ser reduzido enzimaticamente, originando uma anilina que se torna rapidamente ligada ao húmus do solo. As ligações húmus-anilinas são altamente estáveis, ocasionando o problema do resíduo do agrotóxico ligado ao solo. Essa ligação diminui a mineralização dos resíduos de anilina, porém, até hoje, não há evidências conclusivas de que esse complexo possa ser considerado danoso. Todavia, deve-se estar alerta para a possibilidade de que resíduos de agrotóxicos, imobilizados por ligações com as substâncias húmicas, possam ser remobilizados e permanecer intactos e biologicamente ativos durante a mineralização do material húmico (7). Assim, em condições de laboratório, resíduos elevados de metabólitos de paration foram detectados nos solos gley húmico e latossolo vermelho-amarelo, 200 dias após a aplicação do ¹⁴C-paration nesses solos (4).

HERBICIDAS

Visando à proteção das monoculturas, uma grande variedade de herbicidas vem sendo utilizada. Como os inseticidas, estes agrotóxicos estão

distribuídos por diferentes classes químicas e seu comportamento no solo é também função de sua estrutura química. Classes importantes de herbicidas são por exemplo: triazinas, feniluréias, tiocarbamatos, acilanilidas, cloroacetamidas, amítrolas, ácidos fenoxiacetônicos, carbamatos, fenóis e dinitroanilinas.

Somente dois herbicidas, entretanto, pertencentes ao grupo das dinitroanilinas e das acilanilidas serão abordados.

Dinitroanilinas:

Trifluralina

O herbicida trifluralina (2,2,2-trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-toluidina) (Figura 8), introduzido na agricultura por volta de 1960, é o mais importante representante da classe das dinitroanilinas e é amplamente utilizado em nosso país, principalmente na cultura da soja.

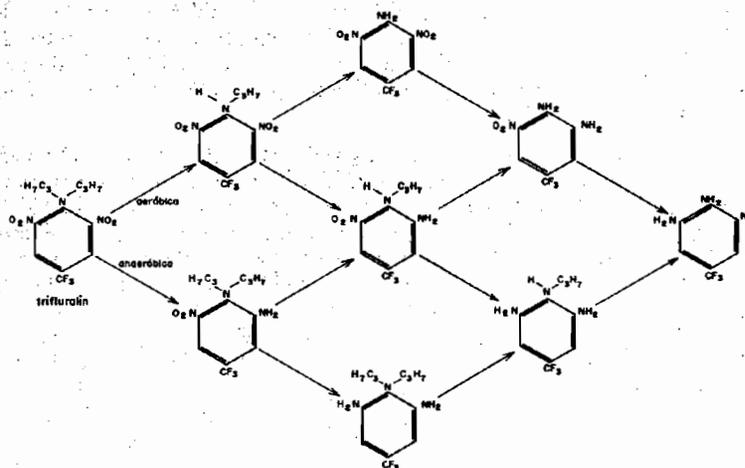


Figura 8. Degradação da trifluralina no solo.

A fotodecomposição e a volatilização contribuem substancialmente para o desaparecimento da trifluralina do solo. Foi demonstrada uma degradação aeróbica e anaeróbica desse herbicida, sendo que a primeira reação de degradação aeróbica se constitui num passo de dealquilação, enquanto que, na

degradação anaeróbica, são os grupos nitro que são inicialmente reduzidos, seguindo-se a dealquilação (46). O metabólito originado em ambos os casos é o 3,4,5-triamino-2,2,2-trifluorotolueno (46).

Em solo siltico argiloso a meia vida da trifluralina variou de 38 para 61 dias dependendo da dose aplicada, sendo a perda atribuída à fotodecomposição, volatilização e principalmente degradação química (14).

Embora muitos estudos tenham sido realizados, muito pouco foi demonstrado efetivamente em relação à atividade microbiana capaz de degradar este herbicida. Assim, de 180 isolados de microrganismos de solos enriquecidos com trifluralina, apenas um destes, que foi identificado como *Candida* sp., apresentou ligeira mineralização do composto (54).

Acilanilidas

Propanil

Como outros herbicidas do grupo das acilanilidas, o propanil é degradado rapidamente no solo por enzimas do grupo das acilanilidas (Figura 9) (9). Os metabólitos originados correspondem a ácidos alifáticos e à anilina. O ácido alifático é posteriormente degradado a CO_2 e H_2O , porém a anilina pode se complexar, formando o resíduo TCNB (3,3',4,4'-tetracloronitrobenzeno), fortemente ligado ao solo através do complexo húmus-anilina. Experimentos de laboratório mostraram que fungos e actinomicetos do solo são capazes de degradar o húmus e liberar o resíduo TCNB, que, no solo, estaria então disponível para ser absorvido por uma próxima cultura (28,50).

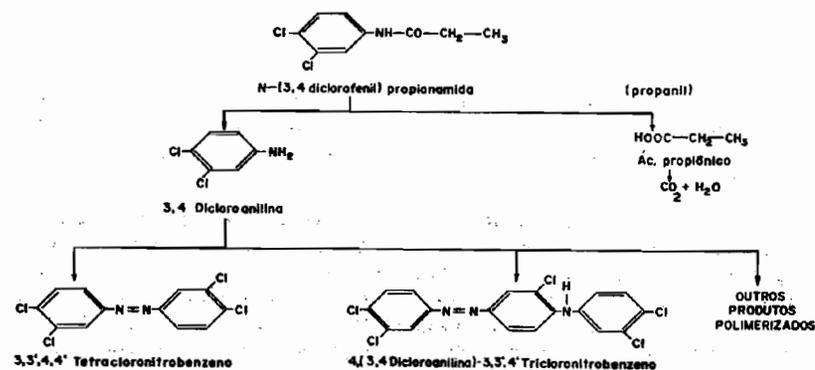


Figura 9. Metabolismo microbiano do propanil.

Em consequência da importância das transformações do nitrogênio para a fertilidade do solo, algumas avaliações têm sido feitas em relação aos efeitos nos processos de mineralização, nitrificação, desnitrificação, nodulação e fixação de N₂ (51).

Grande ênfase nesses estudos tem sido dada, principalmente em relação aos fungicidas, que são aplicados ao solo em altas concentrações, e aos herbicidas muito utilizados nas culturas de leguminosas, pois a nodulação dessas plantas é, muitas vezes, reduzida por tais agrotóxicos.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a fixação de nitrogênio por rizóbio é afetada pelo tratamento de sementes com diferentes fungicidas (thiram, oxicarboxina e outros (16,19,22)).

A influência dos agrotóxicos na atividade biológica do solo como um todo pode ser estudada através da produção de CO₂ pela população microbiana do solo. Bartha e Pramer (8) introduziram o respirômetro para avaliação do efeito do agrotóxico na atividade biológica do solo. Agrotóxicos do grupo dos carbamatos, ciclodienos, feniluréias e tiocarbamatos, aplicados aos solos em concentrações muito elevadas, reduziram a atividade respiratória dos microrganismos do solo (10).

A radiorespirometria introduzida por Mayaudon (38) para os estudos no solo permitiu avaliar, com maior sensibilidade, a atividade microbiana dos solos influenciada pela presença de agrotóxicos. Por esta técnica, a influência de herbicidas do grupo dos fenilcarbamatos na atividade biológica dos solos variou segundo o tipo de solo estudado, sendo a população microbiana de solos argilosos mais sensíveis a estes compostos (11). Medidas radiorespirométricas nos solos gley húmico e latossolo vermelho-amarelo, acrescidos dos fungicidas carbendazim e metalaxil, evidenciaram uma inibição na atividade dos dois solos somente pela presença do carbendazim em altas concentrações (500 ppm) (42).

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. In: Agriculture and the Quality of our Environment. Washington, D.C., Amer. Ass. Advan. Sci., 1967. Publ. no. 85, p. 331-342.
- ANDRÉA, M.M.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. Distribution of ¹⁴C in soil and rice plants following applications of ¹⁴C-parathion to soil. *Energ. Nucl. Agric.*, Campinas, 5(1):41-57, 1983.
- ANDRÉA, M.M.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. Efeito do conteúdo de água na persistência do DDT-¹⁴C em solo sob Cerrado. *Ci. e Cult.*, São Paulo, 37(11):1855-1858, 1985.
- ANDRÉA, M.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R.H.; RUEGG, E.F. The degradation of ¹⁴C-parathion in two brazilian soils. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 4(2):75-78, 1980.
- ANDRÉA, M.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R.H.; RUEGG, E.F. Degradation of parathion by soil kept moist with and without repeated applications. *Environ. Poll.(Series A)*, 27:167-177, 1982.
- BARKER, P.S. & MORRISON, F.O. The metabolism of TDE by *Proteus vulgaris*. *Can. J. Zool.*, Ottawa, 43:652-654, 1965.
- BARTHA, R. Pesticide residues in Humus. *ASM News*, New York, 46:356-370, 1980.
- BARTHA, R. & PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.*, Baltimore, 100:68-70, 1967.
- BARTHA, R. & PRAMER, D. Metabolism of acylanilide herbicides. *Adv. Appl. Microbiol.*, New York, 13:317-341, 1970.
- BARTHA, R.; LANZILOTTA, R.P.; PRAMER, D. Stability and effects of some pesticides in soil. *Appl. Microbiol.*, Baltimore, 15:67-75, 1967.
- BELLINCH, C. & MAYAUDON, J. Influence du phenmediphame et dérivés sur l'activité biologique et le nombre de microorganismes des sols frais. *Rév. Écol. Biol. Sol.*, Bruxelles, 15:435-44, 1978.
- BIXBY, N.W.; BOUSH, C.M.; MATSUMURA, F. Degradation of dieldrin to carbon dioxide by a soil fungus: *Trichoderma koningi*. *Bull. Environ. Toxicol.*, New York, 6:491-494, 1971.
- BOLLAG, J.M. & LIU, S.Y. Hydroxylations of carbaril by soil fungi. *Nature*, London, 236:177-178, 1972.
- CAMPANHOLA, C.; BROMILOW, R.H.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. Comportamento de metribuzin e trifluralina no solo e sua absorção por soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, Rio de Janeiro, 17:565-571, 1982.
- CARAZO, E.; RUEGG, E.F.; WIENDL, F.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R. Degradación y comportamiento de ¹⁴C-carbaril en dos suelos brasileños. *Agronm. Costarr.*, San José, 6:81-82, 1982.
- DE-POLLI, H.; SOUTO, S.M.; FRANCO, A.A. Compatibilidade de Agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a simbiose das Leguminosas. Ministério da Agricultura. EMBRAPA. U.A.P.N.P.B.S. Seropédica, 1986. 71p.
- DEWEY, J.E. & PARKER, B.L. Increase in toxicity to *Drosophila melanogaster* of phorate-treated soils. *J. Econ. Entomol.*, Washington, 58:491-497, 1965.
- EDWARD, C.A. *Persistent Pesticides in the Environment*, Cleveland, 2. ed. Chemical Rubber Co. Press, 1973. 170p.
- FISHER, D.J. Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Pestic. Sci.*, Oxford, 7:10-18, 1976.

20. FOCHT, D.C. & ALEXANDER, M. DDT metabolites and analogs. Ring fission by *Hydrogenomonas*. Science, Washington, 170:91-92, 1970.
21. FULLER, W.H. & WARRICK, A.W. Soils in waste treatment and utilization. vol I - Land treatment. Boca Raton, CRC Press, Florida. 1985. pp. 268.
22. GRAHAM, P.H.; OCAMPO, G.; RUIZ, L.D.; DUQUE, A. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. Agron. J., Madison, 72:625-627, 1980.
23. GUENZI, W.D. & BEARD, W.E. Anaerobic conversion of DDT to DDD and aerobic stability of DDT in soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Madison, 32:522-524, 1968.
24. HELENE, C.G.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. The persistence, leaching and volatilization of ¹⁴C-aldrin in two brazilian soils. Ci. e Cult., São Paulo, 33:101-105, 1981.
25. HELENE, C.G.; RUEGG, E.F.; LORD, K.A. Decomposição do ¹⁴C-malathion em amostras de três solos do Brasil. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 17:293-298, 1982.
26. HELWEG, A. Microbial breakdown of the fungicide Benomyl. Soil Biol. Biochem., Oxford, 4:377-378, 1972.
27. HIRATA, R.; LUCHINI, L.C.; MESQUITA, T.B.; RUEGG, E.F. Influência de nutrientes orgânicos na persistência do carbaril em solos. Turrialba, San José, 32:441-445, 1982.
28. HSU, T.S. & BARTHA, R. Biodegradation of chloroaniline-humus complexés in soil and in culture solution. Soil Sci., Baltimore, 118:213-220, 1974.
29. JOHNSON, D.P. & STANSBURY, H.A. Adaptation of Sevin insecticides (carbaril) residue method to various crops. J. Agr. Food Chem., Washington, 13:235-238, 1965.
30. KATAN, J.; FUHREMANN, T.W.; LICHTENSTEIN, E.P. Binding of ¹⁴C-parathion in soil: reassessment of pesticide persistence. Science, Washington, 193:891-894, 1976.
31. KAZANO, H.; KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. Metabolism of methylcarbamate insecticides in soils. J. Agric. Food Chem., Washington, 20:975-979, 1972.
32. LICHTENSTEIN, E.P. & SCHULZ, K.R. Breakdown of lindane and aldrin in soils. J. Econ. Entomol., Washington, 52:118-124, 1959.
33. LICHTENSTEIN, E.P. & SCHULZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soil with special emphasis on parathion. J. Econ. Entomol., Washington, 57:618-627, 1964.
34. LORD, K.A.; ANDRÉA, M.M.de; HELENE, C.G.; RUEGG, E.F. Laboratory tests of the persistence of pesticides in two brazilian soils. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 45:197-200, 1978.

35. LUCHINI, L.C.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. Sorção e dessorção de inseticidas em solos brasileiros. Ci. e Cult., São Paulo, 33:97-101, 1981.
36. MATSUMURA, F. & BOUSH, G. Malation degradation by *Trichoderma viride* and a *Pseudomonas* species. Science, Washington, 153:1278-1280, 1966.
37. MATSUMURA, F. & BOUSH, G. Dieldrin degradation by soil microorganisms. Science, Washington, 156:959-961, 1967.
38. MAYAUDON, J. Use of radiorespirometry in soil microbiology and biochemistry. In: MC LAREN, A.D. & SKUJINS, J.J. Soil Biochemistry., New York, Marcel Dekker, 1971.
39. MENZIE, C.M. Metabolism of pesticides. U. S. Fish Wildl. Sers. Spec. Sci. Washington, Rep 127, 1969.
40. MOSTAFA, I.Y.; BAHIG, M.R.E.; FAKHR, I.M.I.; ADAMS, Y. Malathion breakdown by soil fungi. Z. Naturforsch., 27:1115-1116, 1972.
41. MUSUMECI, M.R.; & RUEGG, E.F. Degradação microbiana do fungicida metalaxil no solo. Fitop. Bras., Brasília, 9:583-591, 1984.
42. MUSUMECI, M.R.; RUEGG, E.F. Influência dos fungicidas carbendazin e metalaxil na atividade biológica de solos. Ci. e Cult., São Paulo, 36:618-621, 1984.
43. MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Persistência do fungicida carbendazin em amostras de solos do Rio Grande do Sul. Fitop. Bras., Brasília, 5:305-309, 1980.
44. MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Adsorção in vitro do aldrin e seus metabólitos por fungos de solos. Ci. e Cult., São Paulo, 34(3):381-385, 1982.
45. MUSUMECI, M.R.; LORD, K.A.; RUEGG, E.F. Adsorption, movement and persistence of carbendazin in brazilian soils. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 47:9-14, 1980.
46. PROBST, G.W.; GOLAB, T.; HERBERG, R.J.; HOLZER, F.J.; PARKA, S.J.; VAN DER SCHANS, C.; TEPE, J.B. Fate of trifluralin in soils and plants. J. Agr. Food Chem., Washington, 15:592, 1967.
47. SETHUNATHAN, N.; BAUTISTA, E.N.; YOSHIDA, T. Degradation of benzene hexachloride by a soil bacterium. Can. J. Microbiol., Ottawa, 15:1349-1354, 1969.
48. SHAROM, M.S. & EDGINGTON, L.V. The adsorption, mobility and persistence of metalaxil in soil and aqueous systems. Can. Plan. Pathol., Ottawa, 4:334-340, 1982.
49. SIEGEL, M.R. Benomyl - Soil microbial interactions. Phytopathology, St. Paul, 65:219-220, 1975.
50. STILL, G.G. & MANSEGER, E.R. The presence of 3,4-dichloroaniline in rice grain hydrolysates. Weed. Res., Oxford, 9:218-233, 1969.

51. TU, C.M. Effect of pesticides on acetylene reduction and microorganisms in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 10:451-456, 1978.
52. TU, C.M.; MILES, J.R.; HARRIS, C.R. Soil microbial degradation of aldrin. *Life Sci.*, 7:311-323, 1968.
53. YUL, W.N.; CHIBA, M.; MORLEY, H.U. Fate of insecticide residues. Decomposition of lindane in soil. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, 15:1000-1004, 1967.
54. ZEYER, J. & KEARNEY, P.C. Microbial dealkylation of trifluralin in pure culture. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20:10-18, 1983.

